



**Spezifische Bindung von Aluminium und Eisen an den
kationenselektiven Kanal MppA von *Microthrix parvicella***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tobias Knaf

aus Hanau

Würzburg, 2012

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter :

.....

Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Diese Dissertation wurde von mir selbständig und nur mit den
angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt.

Die von mir vorgelegte Dissertation hat noch in keinem früheren
Prüfungsverfahren in ähnlicher oder gleicher Form vorgelegen.

Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, einen akademischen
Grad zu erlangen.

Würzburg, den

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 Die biologische Abwasserreinigung	10
1.1.1 Geschichte der Abwasserreinigung	10
1.1.2 Die biologische Abwasserreinigung	11
1.2 Problematik bei Hoch-und Niedriglastanlagen	25
1.3 Der Organismus <i>Microthrix parvicella</i>	30
1.3.1 Wachstum von <i>Microthrix parvicella</i>	31
1.3.2 Nutzung von Nährstoffen	32
1.3.3 Temperaturabhängigkeit und pH-Wert-Optimum	34
1.3.4 Mikroaerophilie	34
1.3.5 Nutzung und Speicherung von Lipiden	35
1.3.6 Monod-Kinetik nach Chudoba et al.	36
1.3.7 Weitergehende Bekämpfungsmaßnahmen von <i>Microthrix parvicella</i>	38
1.4 Die biologische Membran	39
1.4.1 Aufbau einer biologischen Membran	39
1.4.2 Das Flüssig-Mosaik-Modell	44
1.4.3 Porenformende Proteine (Porine)	46
2 ZIEL/MOTIVATION DER ARBEIT	49
3 MATERIAL UND METHODEN	50
3.1 Verwendete Bakterienstämme	50
3.2 Anzucht der Reinkulturen	50
3.3 Isolation der Zellwand	52
3.4 Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine	53
3.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	55
3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge	56
3.7 SDS-PAGE	57
3.7.1 Herstellung der SDS Gele und Durchführen eines Elektrophoreselaufs ..	58
3.8 Färbemethoden	59
3.8.1 Coomassie-Färbung	59
3.8.2 Silberfärbung	60
3.8.3 Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau	61
3.9 Gelelution	61
3.10 Black Lipid Bilayer	62
3.10.1 Theorie des Black Lipid Bilayers	63
3.10.2 Aufbau der Messapparatur am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg	63
3.10.3 Vorbereitung einer Messung mit der Bilayer-Apparatur	65
3.10.4 Digitalisierung von Messaufzeichnungen	66
3.10.5 Einzelkanalmessungen	67
3.10.6 Messung der Ionenselektivität	69
3.10.7 Messung der Spannungsabhängigkeit	70
3.10.8 Bindungsmessung mit Hilfe der Titrationsmethode	71
4 ERGEBNISSE	74

4.1	Anzucht der Reinkulturen von <i>Microthrix parvicella</i>	74
4.2	Isolierung der Zellwand von <i>Microthrix parvicella</i>	75
4.3	Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine	78
4.4	Einzelkanalmessungen eines Porins von <i>Microthrix parvicella</i>	84
4.5	Selektivität von MppA	90
4.6	Spannungsabhängigkeit von MppA	91
4.7	Bindungsmessungen mit Hilfe der Titrationsmethode.....	93
4.8	Einfluss polyvalenter Kationen auf die Ionenselektivität von MppA.....	101
5	DISKUSSION.....	103
5.1	Anzucht der Reinkulturen von <i>Microthrix parvicella</i>	103
5.2	Isolierung der Zellwand von <i>Microthrix parvicella</i>	105
5.3	Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine	107
5.4	Einzelkanalmessungen eines Porins aus <i>Microthrix parvicella</i>	113
5.5	Selektivität von MppA	117
5.6	Spannungsabhängigkeit von MppA	118
5.7	Bindungsmessungen mit Hilfe der Titrationsmethode.....	119
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSSICHTEN.....	126
7	LITERATURVERZEICHNIS	129
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	137
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	142
10	ANHANG	144
10.1	Verwendete Geräte mit Herstellerangabe.....	144
10.2	Verbrauchsmaterialien.....	145
10.3	Molekulargewichtstandards.....	145
10.4	Puffer und Lösungen	146
10.4.1	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE nach Laemmli.....	146
10.4.2	Puffer und Lösungen für Färbungen.....	147
10.4.3	Puffer und Lösungen für den NADH-Oxidase-Test.....	149
10.4.4	Puffer für FPLC	150
10.5	Medien und Agarplatten	150
10.6	Bakterienstämme	151
11	ABKÜRZUNGEN, GRÖSSEN UND EINHEITEN	152
11.1	Abkürzungen	152
11.2	Größen und Einheiten.....	153

ZUSAMMENFASSUNG

Schwermetallsalze wie beispielsweise Aluminium- oder Eisensalze werden in der Abwasserbehandlung zur Prävention und Bekämpfung von Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaumbildung verwendet. Dadurch kann eine Verbesserung der Schlammabsetzeigenschaften im Nachklärbecken erreicht werden. Übermäßiges Wachstum des grampositiven Bakteriums *Microthrix parvicella* gilt dabei als Hauptursache von Schlammabsetzproblemen und kann ebenfalls durch die Dosierung von schwermetallhaltigen Flockungs- und Fällungsmitteln vermieden werden. Da diese Verbindungen in Wasser gelöst sind, müssen sie die Außenmembran bestimmter Bakterien passieren. Nur der Einbau von wassergefüllten Kanälen erlaubt den gelösten Salzen das Passieren der durch hydrophobe Fettsäuren aufgebauten zusätzlichen Permeabilitätsbarriere.

In dieser Arbeit wurden wassergefüllten Kanäle von *Microthrix parvicella* isoliert, aufgereinigt und mit Hilfe der Black-Lipid-Bilayer-Technik charakterisiert. Ergänzend wurde der Einfluss und der Durchlass der Flockungs- und Fällungsmittel in Titrationsexperimenten untersucht. Dabei konnte ein wassergefüllter Kanal, der die Bezeichnung MppA erhielt, gefunden werden, welcher eine Leitfähigkeit von 600 pS in 1 M Kaliumchlorid und eine Bindestelle für mehrwertige Kationen wie Eisen oder Aluminium zeigte. Die Bindung dieser mehrwertigen Kationen führte zu einer Änderung der Ionenselektivität. Ohne Bindung mehrwertiger Kationen zeigte der Kanal eine leichte Kationenselektivität. Nach der Bindung wechselte die Ionenselektivität zu einer Anionenselektivität, was auf eine spezifische Ladungsverteilung im Kanal hinweist.

Der Kanal MppA zeigte gleichwertige Bindekonstanten für Aluminium und Eisen. Beide Metalle werden als Fällungs- und Flockungsmittel in Kläranlagen zum Verhindern von Schwimm- und Blähschlamm verwendet. Frühere Arbeiten offenbarten bereits, dass hauptsächlich der Aluminiumanteil entscheidend für die Wirkung dieser Mittel ist. Diese Beobachtungen in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit führten zu der Annahme, dass Eisen und Aluminium eine kompetitive Bindung an der Bindestelle im Kanalinneren zeigen könnten. So könnte in manchen Fällen Aluminium anstelle des sonst als Spurenelement benötigten Eisens durch den Kanal transportiert werden und in Enzym-Substrat-Komplexen eingebaut werden. Dadurch könnten toxische Effekte auftreten, die letztlich ein Absterben des Organismus zur Folge hätten.

Für die Bindung der Metallsalze konnte zusätzlich eine pH-Abhängigkeit beobachtet werden. Nur eine Zugabe von Metalllösungen mit einem pH-Wert kleiner 6 führte zu einer Bindung im Kanal. Die Zugabe von Metalllösungen mit einem pH-Wert größer 6 zeigte keinen Effekt auf die Leitfähigkeit des Kanals. Diese Ergebnisse bestätigen die auf Kläranlagen und in vorherigen Arbeiten getätigte Beobachtung, dass der pH-Wert für die Wirksamkeit der Verbindungen entscheidend ist. In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass der pH-Wert direkt die Bindung der Metallsalze beeinflusst.

SUMMARY

Heavy metal salts like aluminium or iron compounds are used in waste water treatment plants to prevent bulking sludge, floating sludge and foaming and for this reason to enhance the settleability of the sludge flocs in the secondary clarifier. Excessive growth of the Gram-positive bacterium *Microthrix parvicella* is one of the main origins of sludge settlement problems and can be avoided by the dosage of heavy metal salts containing flocculation and precipitations agents as well. As these agents are dissolved in water, they have to pass the outer membrane of certain bacteria. Only the incorporation of water-filled channels into the membrane allows the solutes to pass this second permeability barrier build out of hydrophobic fatty acids.

In this study, the water-filled channels of *Microthrix parvicella* were characterized with black lipid bilayer assays and the influence and the pass through of the flocculation and precipitations agents were investigated in titration experiments. A water-filled channel called MppA with a conductance of 600 pS in 1 M potassium chloride could be found which has a binding site for polyvalent cations like iron or aluminium. The binding of polyvalent cations to the binding site inside the channel led to a switch in the ion selectivity. Without binding of polyvalent cations, the channel showed slight cation selectivity. After the binding the selectivity switched to an anion selectivity indicating a special charge distribution in the channel.

The channel MppA which was found in *Microthrix parvicella* showed same binding constants for aluminium and iron. Both metals are used as precipitation and flocculation agents and to prevent bulking sludge and floating sludge in waste water treatment plants. Other former works revealed already that only the aluminium part is decisive for the effect of these agents. These observations in addition to the results of this work led to the suggestion that iron and aluminium show a competitive binding to the binding site. In some cases aluminium might be transported through the channel and incorporated to some enzyme-substrate-complexes instead of the iron which usually acts as a micronutrient. This could lead to toxic effects and the dieback of the organism.

A pH-dependency could be found for the binding of the metal salts. Only the addition of metal solutions with a pH lower than 6 led to a binding. The addition of solutions with pH-values higher than 6 showed no effect to the conductivity of the channel. These results confirm the observation done on waste water treatment plants and in other former studies that

the pH value is generally decisive for the effect of the agents. But this work could show for the first time that the pH directly affects the binding of the metal salts.

1 EINLEITUNG

1.1 Die biologische Abwasserreinigung

In den letzten Jahrzehnten wurden die gesetzlichen Vorgaben für Kläranlagen sukzessive verschärft. Dies führte unter anderem zu strengeren Grenzwerten für Kohlenstoffe, Stickstoffe und Phosphor. Besonders die Elimination von Stickstoff- und Phosphorverbindungen stellt dabei besondere Herausforderungen an die Abwasserreinigung dar.

Die Reinigung von Abwasser ist aus den unterschiedlichsten Gründen notwendig. Einer der wichtigsten Ziele der Abwasserreinigung ist die Verbesserung der Hygiene, wodurch Krankheiten, hervorgerufen durch Bakterien oder Pilze im Wasser, verhindert werden sollen. Ein weiteres wichtiges Ziel ist das Verhindern der Eutrophierung von Oberflächengewässern durch unzureichende Elimination von Stickstoff- und Phosphorverbindungen. Da insbesondere diese beiden Stoffe limitierende Faktoren für das Wachstum von Algen sind, kann es bei höheren Konzentrationen zu einem massenhaften Wachstum von Biomasse kommen (DVWK-Regelwerk 1988). Wenn die Biomasse nun abstirbt, steigt der Sauerstoffbedarf im Gewässer aufgrund von Zersetzungsprozessen stark an. Die Sauerstoffkonzentration im Gewässer sinkt ab, wodurch der aerobe Abbau organischer Verbindungen gestoppt wird. Durch anaerobe Bakterien entstehen schließlich bei Zersetzungsprozessen Schwefelwasserstoffe, Ammoniak und Methan, die das Gewässer umkippen lassen und ein Absterben sauerstoffabhängiger Lebewesen verursachen.

Stickstoffe verursachen nicht nur übermäßiges Algenwachstum, sondern können in Form von Ammonium und Nitrat direkte negative Auswirkungen auf Gewässer und Lebewesen haben. Ammonium ist aufgrund seiner reduzierten Form sauerstoffzehrend, wodurch es zu einem Absinken der Sauerstoffkonzentration im Gewässer kommt. Nitrat kann im Körper zu Nitrit reduziert werden, wodurch krebserregende Nitrosamine entstehen können.

1.1.1 Geschichte der Abwasserreinigung

Die Gefahren, die von Abwasser ausgehen können, waren bereits in der Antike bekannt. Es fand jedoch keine Abwasserreinigung im eigentlichen Sinne statt, sondern vielmehr wurde

das Abwasser über Sammelkanäle aus den Städten in die Flüsse geleitet. Dies führte zu einer Verlagerung des Problems von den Städten hinaus auf das Land.

Erst im 20. Jahrhundert fand erstmals eine richtige Abwasserreinigung statt. Im Jahre 1910 wurde eine mechanische Reinigung in Form von Rechen, Sieben und Absetzbecken eingeführt, durch die jedoch nur Grob- und Müllstoffe und ein Teil der Kohlenstoffe entfernt werden konnten.

Ab dem Jahre 1970 wurde die Gesetzgebung im Abwasserbereich deutlich strenger. Eine alleinige mechanische Reinigung wurde als nicht mehr ausreichend betrachtet und zusätzlich zur Kohlenstoffelimination rückte die Entfernung von Stickstoffen und Phosphorverbindungen in den Fokus. Grenzwerte für Kohlenstoffe wurden verschärft und in Abhängigkeit der Anlagengröße auch für Stickstoffe und Phosphor eingeführt. Um die Einhaltung der strengen Grenzwerte zu garantieren, wurde eine an die mechanische Reinigung anschließende biologische Reinigung durch Mikroorganismen zwingend vorgeschrieben. Somit konnten die Einleitungen von Schmutzstoffen in die Oberflächengewässer deutlich reduziert werden, was zu einer allgemeinen Verbesserung des biologischen Zustands der Fließgewässer führte.

1.1.2 Die biologische Abwasserreinigung

Die Einführung der biologischen Abwasserreinigung führte zu einem typischen Fließschema für Kläranlagen (Abbildung 1). Eine Kläranlage besteht üblicherweise aus der Vorklärung, der biologischen Reinigung („Biologie“) und der Nachklärung.

Zunächst wird das Abwasser aus dem Zulauf (Kanalisation) falls nötig auf das Niveau der Kläranlage angehoben. Dort durchläuft das Abwasser als erstes die mechanische Reinigungsstufe, bestehend aus Rechen, Sandfang, Fettfang und Vorklärung.

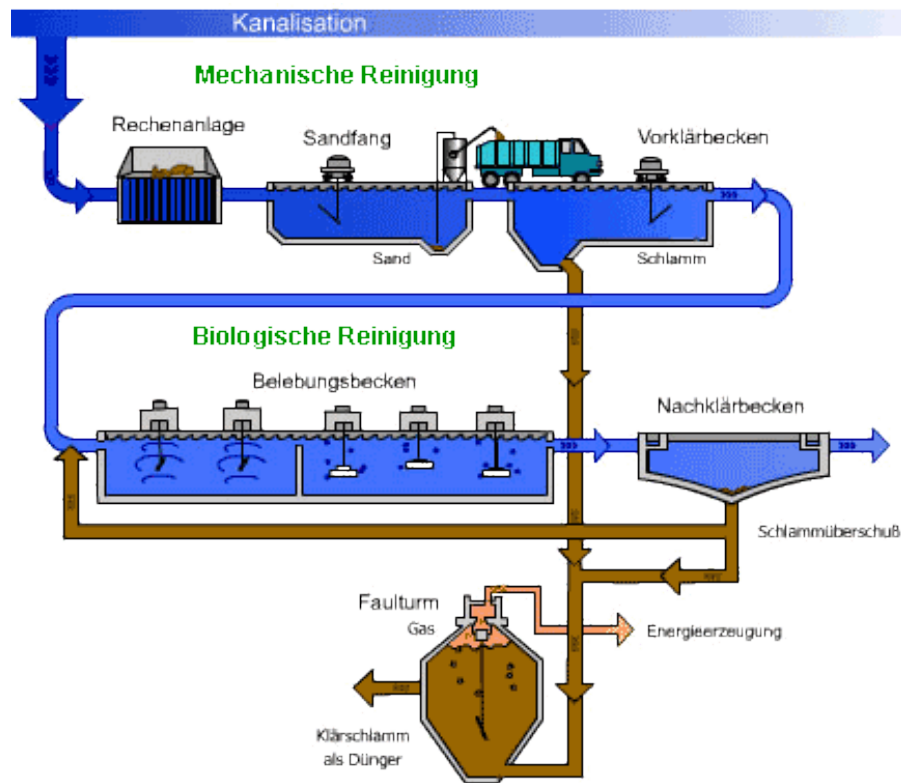


Abbildung 1: Fließschema einer kommunalen Kläranlage mit Vorklärung und Faulung (von der Homepage des Bundesverbandes für Gas und Wasser, 2010). Nach einer zunächst mechanischen Reinigung wird das Abwasser in der biologischen Reinigungsstufe insbesondere von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen befreit. Der in der mechanischen und biologischen Reinigungsstufe anfallende Klärschlamm kann zur Faulgasproduktion anaerob verwertet werden.

Das Rechenwerk (Abbildung 2) bildet den ersten Teil der mechanischen Reinigungsstufe und dient der Entfernung von Grob- und Müllstoffen in Form von Papier, Plastik, Hygieneartikeln oder ähnlichem. Die Entfernung dieser Stoffe ist dringend notwendig, um einen störungsfreien Betrieb der Kläranlage zu garantieren (Vermeiden von verstopften Pumpen und blockierten Rührwerken). Um die Grob- und Müllstoffe aus dem Abwasser abzusondern, werden Grob- und Feinrechen, sowie Siebe und Feinstsiebe verwendet. Diese fahren durch das Abwasser und sortieren aufgrund unterschiedlicher Maschenweiten (0,01-1 mm bei Feinstsieben bis zu 40-500 mm bei Grobrechen) größere Stoffe heraus (ATV-Handbuch 1997). Die gesammelten Stoffe gelangen direkt vom Rechenwerk maschinell in Müllcontainer und werden letztendlich der Müllverbrennung zugeführt.



Abbildung 2: Recheneinheit zur Entfernung von Grob- und Müllstoffen aus dem Abwasser. (Foto: Knaf)

Auf das Rechenwerk folgt in den meisten Kläranlagen der Sandfang (Abbildung 3). Der Sandfang dient zur Abscheidung von Sand, Erd- und Kiespartikeln aus dem Wasser und besteht aus einer langen Rinne. Die Strömungsgeschwindigkeit wird dabei über die Länge hin immer weiter herabgesetzt. Durch die niedrige Fließgeschwindigkeit und den rinnenförmigen Aufbau des Sandfangbeckens haben die schwereren Partikel genügend Zeit zu sedimentieren, um am Boden durch automatische Sandräumer wie Schild- oder Saugräumer dem Reinigungsprozess entzogen zu werden. Oftmals ist im Sandfang ein zusätzlicher Fettfang integriert. Dazu trennt eine Platte oder Mauer den Fettfang vom Sandfang ab. Das besondere an dieser Abtrennung ist, dass diese nicht durchgängig verläuft, sondern einen Durchlass am Beckenboden gewährt. Durch gezielte Belüftung des Sandfangs entsteht im Wasser eine kreisförmige Strömungsbewegung. Diese drückt einen Teil des Wassers unter der Abtrennung hindurch in den Fettfang. Das Fett flotiert im Fettfang und kann somit an der Wasseroberfläche abgezogen werden.



Abbildung 3: Belüfteter Sandfang einer kommunalen Kläranlage mit integriertem Fettfang (rechts). Durch Erzeugung einer kreisförmigen Strömungsbewegung im Sandfang flotiert das Fett im nicht belüfteten Fettfang und kann dort an der Wasseroberfläche abgezogen werden. (Foto: Knaf)

Auf den Sandfang folgt üblicherweise die Vorklärung (Abbildung 4). Die Vorklärung ist ein unbelüftetes, rinnenartiges Becken und dient der Abtrennung von Feststoffen aus dem Abwasser. Durch Sedimentation und Flotation können dabei große Anteile des Kohlenstoffs, gemessen durch den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB), entfernt werden. Der chemische Sauerstoffbedarf CSB beschreibt den Verschmutzungsgrad des Abwassers und ähnelt dem biologischen Sauerstoffbedarf BSB. Im Gegensatz zum biologischen Sauerstoffbedarf erfasst der chemische Sauerstoffbedarf jedoch durch Verwendung starker Oxidationsmittel wie Dichromate oder Permanganate auch schwer oxidierbare Substanzen im Wasser und liegt daher meist über dem BSB.

Um ein optimales Absetz- beziehungsweise Flotationsverhalten der festen Partikel im Vorklärbecken zu gewährleisten, wird die Fließgeschwindigkeit im Vorklärbecken im Vergleich zum Sandfang noch weiter herabgesetzt. Die abgesetzten oder aufschwimmenden Feststoffe können über Räumler entfernt werden und bilden den sogenannten Primärschlamm. Dieser wird nach einem Eindickungsprozess den Faultürmen zugeführt, wo anaerobe Bakterien den Primärschlamm verarbeiten. Dabei entsteht neben Kohlendioxid auch Methan, welches als Biogas im Blockheizkraftwerk oder durch Mikrogasturbinen verstromt werden kann.



Abbildung 4: Vorklärung zur Abtrennung von Feststoffen aus dem Abwasser, wodurch bereits große Mengen des CSBs eliminiert werden können. Aufgrund einer gradientenförmigen Herabsetzung der Fließgeschwindigkeit setzen sich schwerere Feststoffe am Beckenboden ab beziehungsweise leichtere Feststoffe schwimmen an der Wasseroberfläche auf und können somit dem Abwasser entzogen werden. (Foto: Knaf)

Die Vorklärung bildet den Abschluss der mechanischen Reinigungsstufe. Von ihr gelangt das Abwasser in das Belebungsbecken, in dem die biologische Reinigung durch eine Vielzahl unterschiedlichster Mikroorganismen stattfindet. Häufig wird auf die Vorklärung verzichtet, da dem Reinigungsprozess dabei eventuell später benötigter Kohlenstoff entzogen wird.

Im Belebungsbecken (Abbildung 5) befindet sich eine Population aus verschiedenen Mikroorganismen. Den Mikroorganismen kommen dabei unterschiedlichste Aufgaben zu. Sie sind verantwortlich für Nitrifikation, Denitrifikation, Kohlenstoffabbau und Phosphatspeicherung. Sie ermöglichen also die effektive Elimination von organischen und anorganischen Schmutzstoffen aus dem Abwasser.

Bei der Elimination der Schmutzstoffe sind prinzipiell zwei unterschiedliche Wege möglich. Der vielleicht einfachste Weg ist die Umwandlung in gasförmige Verbindungen. Diese Umwandlung findet durch die Respiration der Bakterien statt. Dabei entsteht aus Kohlenstoffverbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff gasförmiges Kohlendioxid und aus Stickstoffverbindungen atmosphärischer Luftstickstoff. Beide Gase verlassen die Kläranlage in die Atmosphäre und sind daher dem Abwasser entzogen. Ein zweiter Weg der Schmutzstoffelimination ist das Biomassewachstum beziehungsweise die Adsorption von Schmutzstoffen an den Klärschlamm. Die Biomasse wächst und verwendet dabei Stoffe, die im Abwasser vorhanden sind (Kohlenstoffe, Stickstoffe, Phosphorverbindungen). Gleichzeitig

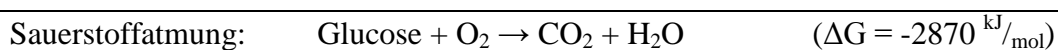
können Schmutzstoffe auch eingelagert werden oder haften einfach nur an der Oberfläche der Schlammflocke an. Entzieht man nun dem Belebungsbecken Klärschlamm beziehungsweise Biomasse, werden gleichzeitig eingebaute beziehungsweise angelagerte Schmutzstoffe entfernt. Dieser abgezogene Klärschlamm wird auch als Sekundärschlamm bezeichnet und kann nach Eindicken zusammen mit dem Primärschlamm aus der Vorklärung durch anaerobe Bakterien im Faulurm vergärt werden.



Abbildung 5: Belebungsbecken einer kommunalen Kläranlage in der belüfteten Phase. (Foto: Knaf)

Betrachtet man den Abbau von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch Respiration genauer, fällt auf, dass der Abbau von Stickstoffen zu atmosphärischen Stickstoff wesentlich komplexer ist als der Abbau von Kohlenstoffen zu Kohlendioxid.

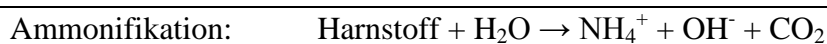
Die Umwandlung von Kohlenstoffverbindungen zu Kohlendioxid wird als Sauerstoffatmung bezeichnet. Kohlenstoff, beispielsweise in Form von Glucose, wird unter aeroben Bedingungen, d.h. unter Anwesenheit von Sauerstoff, zu Kohlendioxid umgewandelt. Dabei beträgt der Energiegewinn für die Mikroorganismen 2870 kJ pro Mol Glucose (ATV-Handbuch 1997). Die nachfolgende Reaktionsgleichung beschreibt die Umwandlung der verschiedenen Stoffe bei der Sauerstoffatmung.



Der Abbau von Stickstoffverbindungen ist dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Vorgänge stattfinden müssen, die unterschiedlichste Substratansprüche besitzen. Nimmt man

noch die Umwandlung von Harnstoff zu Ammoniak/Ammonium hinzu, so lässt sich der Stickstoffabbau sogar in drei Teilschritte unterteilen.

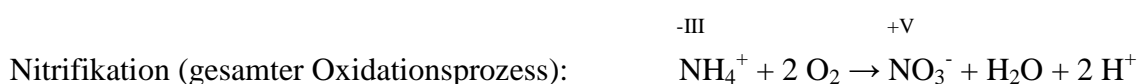
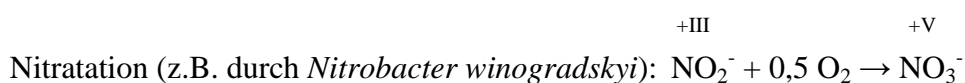
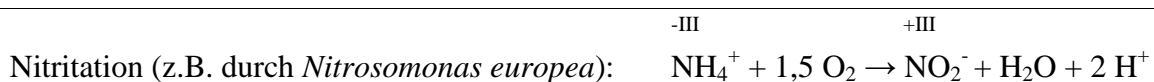
Der erste Schritt des Abbaus von Stickstoffverbindungen, in diesem Fall der Abbau von Harnstoff zu Ammonium, wird als Ammonifikation bezeichnet. Die Ammonifikation findet bereits im Kanalnetz durch Bakterien der sogenannten Sielhaut statt. Die Sielhaut befindet sich auf den Wänden des Kanalnetzes und wird vom Abwasser überströmt. Das durch die Ammonifikation entstehende Ammonium ist aufgrund der langen Verweilzeit im Kanal die Hauptstickstoffquelle im Kläranlagenzulauf. Die nachfolgende Reaktionsgleichung beschreibt die Umwandlung von Harnstoff zu Ammonium während der Ammonifikation.



Der Abbau von Ammonium in der Kläranlage findet überwiegend im Belebungsbecken durch nitrifizierende Bakterien, den sogenannten Nitrifikanten, statt. Der als Nitrifikation bezeichnete Abbau ist ein Oxidationsprozess, der somit nur in aeroben Phasen, d.h. in Anwesenheit von freiem Sauerstoff, stattfinden kann.

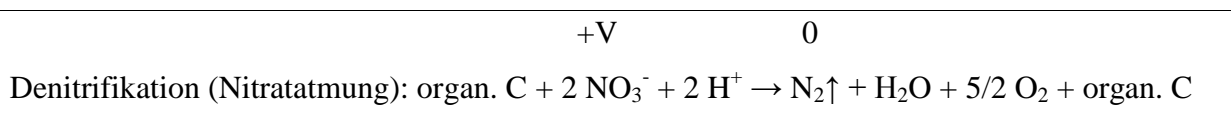
Die Hauptvertreter der für die Nitrifikation zuständigen Nitrifikanten sind Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* und *Nitrobacter*. Im ersten Schritt der Nitrifikation, der Nitritation, oxidieren *Nitrosomonas*-Bakterien Ammonium zu Nitrit. Dabei entstehen zusätzlich zwei freie Protonen, wodurch das umgebende Medium leicht angesäuert wird. Im zweiten Nitrifikationsschritt, der Nitratation, wird das in der Nitritation entstandene Nitrit durch Bakterien der Gattung *Nitrobacter* weiter zu Nitrat oxidiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Nitrifikation die Stickstoffverbindungen von der Oxidationsstufe –III (NH_4^+) zur höchsten Oxidationsstufe +V (NO_3^-) oxidiert werden. Die Prozesse der Nitrifikation werden nachfolgend noch einmal kurz dargestellt.



Bei der anschließenden Denitrifikation findet eine Reduktion der in der Nitrifikation oxidierten Stickstoffverbindungen statt. Die Stickstoffverbindungen werden dabei von der Oxidationsstufe +V (NO_3^-) über verschiedene Zwischenstufen zur Oxidationsstufe 0 (N_2) reduziert. Dieser Reduktionsprozess kann nur unter anoxischen bzw. anaeroben Bedingungen stattfinden, d. h. wenn die Sauerstoffkonzentration weniger als 0,1 mg/l beträgt. Da somit die Nitrifikation und die Denitrifikation unterschiedliche Ansprüche an den Sauerstoff haben (aerobe Nitrifikation, anaerobe Denitrifikation), können beide Prozesse nicht zusammen stattfinden. Die Oxidations- und die Reduktionprozesse müssen entweder baulich getrennt, d.h. in unterschiedlichen Becken oder Zonen, oder zeitlich getrennt (intermittierender Betrieb) voneinander stattfinden. Aufgrund der meist beschränkten, baulichen Kapazitäten einer Kläranlage wird oft die intermittierende Belüftung angewandt, d.h. Nitrifikation und Denitrifikation findet zeitversetzt im gleichen Becken statt.

Die Denitrifikation erfolgt mittels denitrifizierender Bakterien wie *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* oder *Pseudomonas aeruginosa*. Da die Denitrifikation (auch Nitratatmung genannt) ähnlich abläuft wie die Sauerstoffatmung, wird eine organische Kohlenstoffverbindung (z.B. Acetat, Glucose) als Elektronendonator benötigt. Das Nitrat, welches in der Nitrifikation entstanden ist, wird zu Luftstickstoff reduziert. Dieser kann als Gas in die Atmosphäre entweichen und trägt somit zur effektiven Elimination von Stickstoffverbindungen in Kläranlagen bei. Der Energiegewinn bei der Nitratatmung, angegeben als freie Enthalpie ΔG , ist nur unwesentlich geringer als bei der Sauerstoffatmung. Während bei der Sauerstoffatmung in etwa 2870 kJ pro Mol Glucose frei werden, beträgt der Energiegewinn bei der Nitratatmung in etwa 2700 kJ pro Mol Glucose. Dies entspricht einem Verlust von rund 6% gegenüber der Sauerstoffatmung, der aufgrund der zusätzlichen Enzymsynthese bei der Nitratatmung (Nitratasen, Nitritasen), auftritt (ATV-Handbuch 1997). Die nachfolgende Reaktionsgleichung beschreibt noch einmal kurz die Vorgänge der Denitrifikation mit der Reduktion von Nitrat zu Luftstickstoff.



Neben der Elimination von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen hat das Entfernen von Phosphorverbindungen aus dem Abwasser durch die Einführung gesetzlicher Grenzwerte deutlich an Bedeutung gewonnen. Für die Elimination von Phosphor gibt es die Möglichkeit

des Zellwachstums, der Entfernung über polyphosphatspeichernde Bakterien oder letztendlich der Elimination durch chemische Fällung.

Das Zellwachstum, d.h. die Zunahme der Biomasse, führt zur Inkorporation von Phosphor in den Bakterien des Belebtschlammes. Phosphorverbindungen sind beispielsweise Bestandteile von DNA und RNA und spielen eine entscheidende Rolle bei der Energiegewinnung (Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP)). Weiterhin ist Phosphor durch verschiedene Phosphorylierungsprozesse ein wichtiger Baustein der Regulationsmechanismen von Lebewesen. Entfernt man nun die entstandene Biomasse über den Überschussschlamm, können mit den Bakterien auch die eingebauten Phosphorverbindungen entfernt werden. Somit werden allein aufgrund des Zellwachstums bis zu 30 % des im Abwasser vorhandenen Phosphors eliminiert (ATV-Handbuch 1997).

Die zweite Möglichkeit der Elimination von Phosphorverbindungen, die Polyphosphatspeicherung durch Bakterien, wird auch Bio-P-Elimination genannt. Dabei können zwei verschiedene Prozesse beobachtet werden. Beim sogenannten „overplus phenomen“ werden Bakterien zur Polyphosphatspeicherung veranlasst, wenn ein längerer Phosphatmangel vorausgegangen ist. Dieser Mangel kommt in Kläranlagen jedoch nicht vor. Daher findet vielmehr ein „luxury uptake“ der Bakterien in Kläranlagen statt, d.h. eine Überkompensation durch polyphosphatspeichernde Bakterien (Levin und Shapiro 1965; Vacker et al. 1967). Allein aufgrund von Stresssituationen speichern die Bakterien ohne vorherigen Phosphatmangel mehr Phosphat ein als sie vorher abgegeben haben. Entfernt man nun die Bakterien mit gefülltem Polyphosphatspeicher aus dem Abwasser, verringert sich die in den Vorfluter einzuleitende Phosphorbelastung.

Für die Speicherung von Phosphaten in der Bio-P-Elimination ist ein Durchlaufen anaerober und aerober Zonen notwendig (Abbildung 6). Dies führt sogar unter Umständen zu speziellen Bio-P-Becken in Kläranlagen, die oftmals die erste Stufe der biologischen Reinigung bilden.

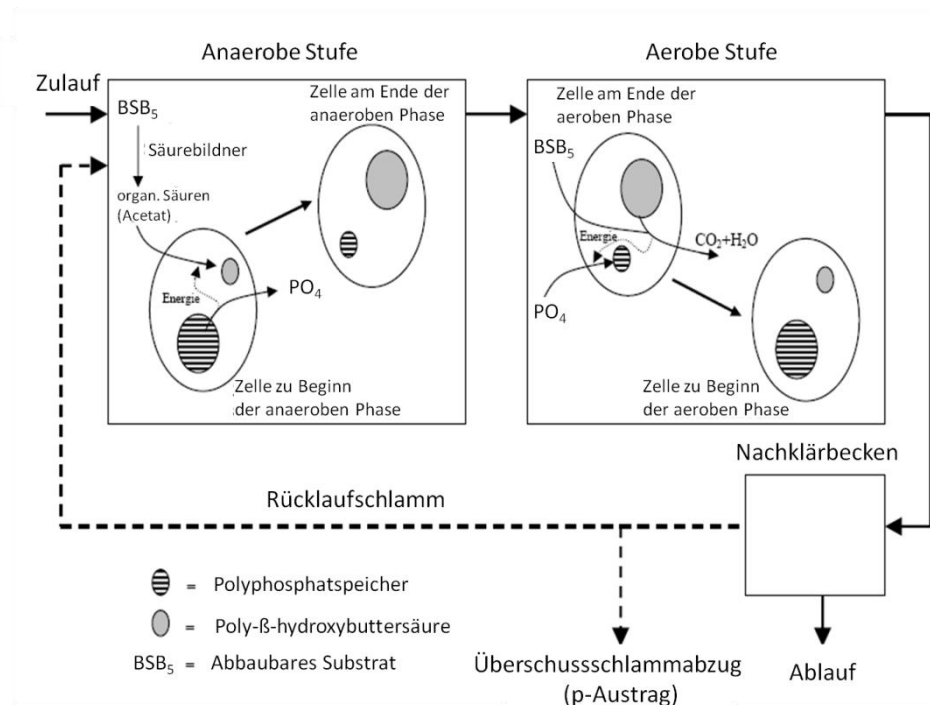


Abbildung 6: Schema für den Abbau von Phosphor durch polyphosphatspeichernde Bakterien nach Helmer und Kunst (Helmer und Kunst 1996). Für die Aufnahme und Rücklösung von Phosphat müssen die polyphosphatspeichernden Bakterien aerobe und anaerobe Phasen durchlaufen.

Das vorgeschaltete Bio-P-Becken ist ein Anaerobbecken mit einer maximalen Konzentration an gelöstem und gebundenem Sauerstoff von kleiner 0,1 mg/l. Das anaerobe Milieu bedeutet eine Stresssituation für die polyphosphatspeichernden Bakterien, die nur durch die Energiegewinnung in Form der Entleerung der Polyphosphatspeicher überleben können. Anaerobe Bakterien vergären dabei zunächst die leicht abbaubaren organischen Kohlenstoffverbindungen zu organischen Säuren, z.B. Acetat. Die organischen Säuren werden anschließend von den obligat anaeroben, polyphosphatspeichernden Bakterien zum Aufbau von Reservestoffen wie beispielsweise Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB) oder Polyhydroxyvaleriansäure (PHV) genutzt. Die im anaeroben Milieu zum Aufbau dieser Reservestoffe benötigte Energie beziehen die polyphosphatspeichernden Bakterien aus ihrem Polyphosphatspeicher. Dieser Polyphosphatspeicher ist daher der entscheidende Vorteil gegenüber anderen aeroben Bakterien, da erst dieser Speicher die PHB-Akkumulation ermöglicht. Wird dem Polyphosphatspeicher Energie entnommen, verkleinert sich dieser und Phosphat wird im Medium rückgelöst. Durch diese Phosphatrücklösung steigt im anaeroben Milieu die Phosphatkonzentration zunächst an.

Im weiteren Verlauf der biologischen Reinigung gelangt das phosphathaltige Wasser und die polyphosphatspeichernden Bakterien, die zu diesem Zeitpunkt entleerte Phosphatspeicher besitzen, in dauerbelüftete beziehungsweise intermittierend belüftete Becken. Diese aeroben Phasen sind für die Aufnahme des gelösten Phosphats und die Auffüllung der Polyphosphatspeicher mit energiereichen Verbindungen essenziell. Die in der aeroben Phase zur Phosphatakkumulation benötigte Energie wird aus dem Oxidationsprozess verschiedener Kohlenstoffverbindungen (CSB/PHB/PHV) gewonnen, bei dem neben Energie auch Kohlendioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) entstehen. Um eventuell folgende Stresssituationen durch Sauerstoffmangel zu überstehen, speichern die Bakterien mehr Phosphat ein als sie vorher in der anaeroben Phase abgeben haben (Abbildung 7). Entfernt man nun die mit Polyphosphat gefüllten Bakterien über den Überschussschlammabzug aus dem Reinigungszyklus, so kann Phosphor wie beim Zellwachstum allein durch biologische Prozesse aus der Kläranlage entfernt werden.

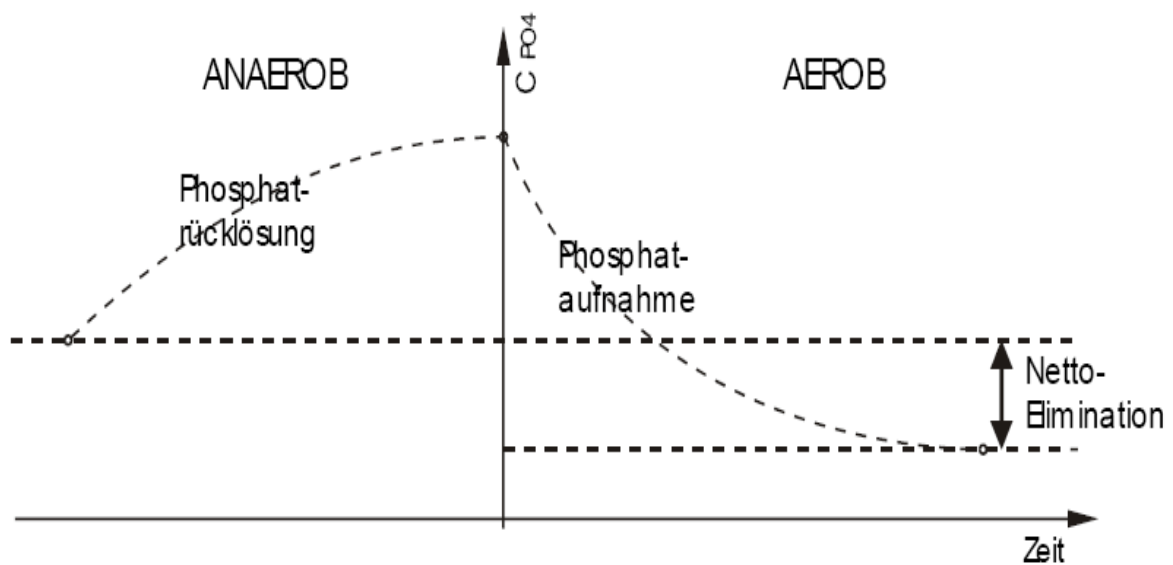
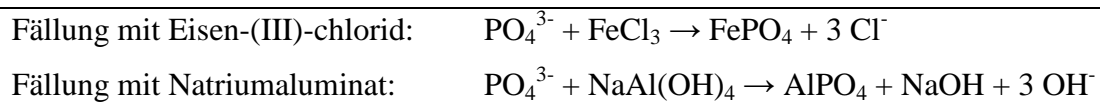


Abbildung 7: Verlauf der Phosphatkonzentration im Belebungsbecken über die Zeit bei der biologischen Phosphatelimination (Schönberger 1988; Schönberger 1989). In der aeroben Phase nehmen die polyphosphatspeichernden Bakterien mehr Phosphat aus dem Medium auf als sie vorher in der anaeroben Phase als Stressreaktion rückgelöst haben.

Eine Alternative zur biologischen Phosphorelimination stellt die Fällung dar. Bei der Fällung durch chemische Fällmittel (z.B. Eisenchloridverbindungen, Eisensulfate, Polymere, Aluminiumverbindungen) wird das im Wasser gelöste Phosphat in ungelöstes Phosphat umgewandelt und fällt als Feststoff aus. Der ausgefallene Feststoff kann anschließend vom

restlichen Abwasser getrennt und somit aus dem Becken entfernt werden. Die gefällten Salze können entweder als Dünger landwirtschaftlich ausgebracht werden oder bei zu hoher Schadstoffbelastung der Verbrennung zugeführt werden. Die nachfolgenden Reaktionsgleichungen zeigen beispielhaft die Fällung von Phosphaten mit Hilfe von Eisen-(III)-chlorid beziehungsweise Natriumaluminat, zwei typischen Fällmitteln in Kläranlagen.



Die chemische Fällung verursacht Kosten und Chemikalien werden in das Abwasser eingetragen. Dennoch ist sie eine wirkungsvolle Methode, um gelösten Phosphor weitestgehend zu eliminieren und die gesetzlichen Grenzwerte für Phosphor einzuhalten. Die chemische Fällung könnte weiter an Bedeutung gewinnen, da in naher Zukunft die Grenzwerte für Phosphor wohl weiter sinken werden. Tabelle 1 zeigt typische Chemikalien in Fäll- und Flockungsmitteln, die auf Kläranlagen Verwendung finden.

Tabelle 1: Chemikalien in handelsüblichen Fäll- und Flockungsmitteln mit Lieferform und weiteren Charakteristika (ATV-Handbuch 1997)

Chemikalie	Chemische Formel	Lieferform	Wirksames Fällmittelion	Lagerform	Dosierung	Dosiermenge ($\beta = 1,5$ bei Fe/Al)
Al	Aluminiumsulfat	Granulat	Al^{3+}	Silo	Dosierschnecke	161 mg/l
	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	Pulver			Dosierpumpe	144 mg/l
	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 14H_2O$ „AVR“	Lösung	Al^{3+}, Fe^{3+}	Silo	Dosierschnecke	
	n $Al_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$	Granulat				
	m $Al_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$	Granulat				
	Aluminiumchlorid	ca. 40 %ige	Al^{3+}	Tank	Dosierpumpe	65 mg/l $AlCl_3$
	$AlCl_3$	Lösung				
	$AlCl_3 + FeCl_3$	Lösung	Al^{3+}, Fe^{3+}	Tank	Dosierpumpe	
	Polyaluminiumchlorid (PAC)	4-8 % Al	Mögliche Polymere			
	$(Al(OH)_x Cl_{3-x})_m$	Lösung	$Al_{13}O_4(OH)_{26}(H_2O)_{10}^{5+}$	Tank	Dosierpumpe	--- (**)
weitere vorpolymerisierte Produkte, z.B. $(Al(OH)_x Cl_y (SO_4)_z)_m$	5 %ige Al Lösung	$Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{10}^{7+}$	Tank, Fässer	Dosierpumpe	--- (**)	
teilweise mit Fe-Anteil		$Al_2(OH)_2^{4+}$				
Natriumaluminat		$Al_8(OH)_{20}(H_2O)_{10}^{4+}$				
$NaAl(OH)_4$	40 %ige	$Al_7(OH)_{17}^{4+}$			57 mg/l	
	Lösung	Al^{3+}	Tank	Dosierpumpe	$NaAl(OH)_4$	
Fe II	Eisen(II)-Sulfat	Salz	Fe^{3+}	Lösebecken/	Dosierpumpe	135 mg/l
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			-bunker		
	$FeSO_4 \cdot 6-7H_2O$	Granulat		Silo	Dosierschnecke	126 mg/l
Fe III	Eisen(III)-Chlorid	30-40 %ige	Fe^{3+}	Tank	Dosierpumpe	79 mg/l
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Lösung				131 mg/l
	Eisen(III)-Sulfat	ca. 40 %ige	Fe^{3+}	Tank	Dosierpumpe	ca. 97 mg/l
	$Fe_2(SO_4)_3$	Lösung				$Fe_2(SO_4)_3$
Eisen(III)-Chloridsulfat	ca. 40 %ige	Fe^{3+}	Tank	Dosierpumpe	91 mg/l	
$FeClSO_4$	Lösung				$FeClSO_4$	
Ca	Kalk	Pulver	Ca^{2+}	Silo	Löschstation mit	50-150 mg/l
	CaO				Dosierpumpe	CaO
	Kalkhydrat	Pulver	Ca^{2+}	Silo	Löschstation mit	50-150 mg/l
	$Ca(OH)_2$				Dosierpumpe	$Ca(OH)_2$
Kalkmilch	Suspension	Ca^{2+}	Tank	Dosierpumpe		

Den Abschluss der biologischen Reinigungsstufe in einer Kläranlage bildet das Nachklärbecken (Abbildung 8). Dieses dient dazu, die Biomasse vom gereinigten Wasser zu trennen, ehe dieses in den Vorfluter, d.h. in ein „natürliches Gewässer“, eingeleitet wird. Die Separation des Belebtschlammes vom Wasser erfolgt mit Hilfe von Sedimentationsprozessen. Der Belebtschlamm hat im optimalen Fall eine höhere Dichte als das Wasser und sinkt daher zum Grund des Beckens ab. Um ein optimales Absetzverhalten zu gewährleisten, ist das Nachklärbecken auf den Prozess abgestimmt aufgebaut. Es ist an der Oberfläche kreisrund und läuft zum Boden hin konisch zusammen. Die Fließgeschwindigkeit ist so gering, dass der Belebtschlamm ausreichend Zeit hat, zum Boden zu sedimentieren. Dort wird der Belebtschlamm abgezogen und als Rücklaufschlamm in die Biologie teilweise zurückgepumpt oder als Überschussschlamm dem Prozess entzogen.



Abbildung 8: Nachklärbecken einer kommunalen Kläranlage zur Abtrennung des Belebtschlammes vom gereinigten Wasser. Durch Herabsetzen der Fließgeschwindigkeit sedimentiert der Belebtschlamm zum Beckenboden. Das verbleibende, gereinigte Wasser wird in den Vorfluter geleitet. (Foto: Knaf)

In das Nachklärbecken integriert ist eine kreisrunde Überlauftrinne, die an der Wasseroberfläche angebracht ist. Das Wasser samt Belebtschlamm wird in das Nachklärbecken eingebracht und hat sich aufgrund der langsamen Fließgeschwindigkeit beim Auftreffen auf die Überlauftrinne möglichst ausreichend vom Belebtschlamm getrennt. Das gereinigte Wasser läuft somit in die Überlauftrinne, von der es in den Vorfluter eingeleitet wird.

Wie bereits beschrieben, kommt dem Absetzverhalten des Belebtschlammes im Nachklärbecken eine besondere Bedeutung zu. Nur bei einer höheren Dichte des Schlammes im Vergleich zum Wasser kann sich der Belebtschlamm ausreichend absetzen. Bei gleicher oder niedrigerer Dichte kann der Belebtschlamm nur unzureichend vom Wasser getrennt werden. Der Schlamm schwimmt an der Oberfläche auf (Schwimmschlamm) oder schwebt im Wasser (Blähschlamm) (Abbildung 9).

Während eine Schwimmschlammdecke durch Oberflächenräumer noch entfernt werden kann, ist es nahezu unmöglich, Blähschlamm vom Wasser zu trennen. Hauptverursacher dieser Belebtschlammproblematik sind filamentöse Aktinobakterien wie *Nocardia* und *Microthrix parvicella* (Rossetti et al. 2005). Besonders *Microthrix parvicella* gilt als Hauptverursacher von Schwimm- und Blähschlamm.



Abbildung 9: Schwimmschlammdecke auf der Oberfläche eines Belebungsbeckens während der unbelüfteten Phase. Aufgrund nicht ausreichend hoher Dichte des Belebtschlammes kann sich dieser nicht mehr komplett absetzen und schwimmt an der Oberfläche auf (Schwimmschlamm) bzw. schwebt im Wasser (Blähschlamm). (Foto: Knaf)

1.2 Problematik bei Hoch- und Niedriglastanlagen

Die Problematik von Schwimm- und Blähschlamm hat sich zusammen mit der Weiterentwicklung der Kläranlagen ergeben, da durch Hoch- bzw. Niedriglastbetrieb der Anlagen unterschiedliche Bakterienbiozönosen entstanden sind. Bei einem Hochlastbetrieb beträgt die Schlammbelastung mindestens $0,2 \text{ kg BSB}_5 / (\text{kg TS} \cdot \text{d})$, wobei die

Schlammbelastung das Verhältnis zwischen der täglichen Schmutzfracht (in kg BSB₅) und der Bakterienmasse im Belebtschlamm (in kg Trockensubstanzgehalt TS) beschreibt. In Hochlastanlagen kommen sogenannte Hochlastbakterien vor, die auch als high F/M-Bakterien bezeichnet werden. F/M steht dabei für das Verhältnis „food to microorganisms“. Diese Hochlastbakterien arbeiten bei hohen F/M-Verhältnissen besonders effektiv, können aber unter bestimmten Stresssituationen (z.B. Sauerstoff-, Stickstoff- oder Phosphormangel) Probleme verursachen. Diese Stresssituationen sind jedoch durch verschiedene Bekämpfungsmaßnahmen wie Vermeidung von Stoßbelastungen oder Einrichtung von Substratgradienten mittels Pfropfenströmung (Dankwerts 1953) gut kontrollierbar. Hauptvertreter der vorwiegend gramnegativen Hochlastbakterien sind *Sphaerotilus natans* (Abbildung 10) oder *Typ 021N* (Abbildung 11).

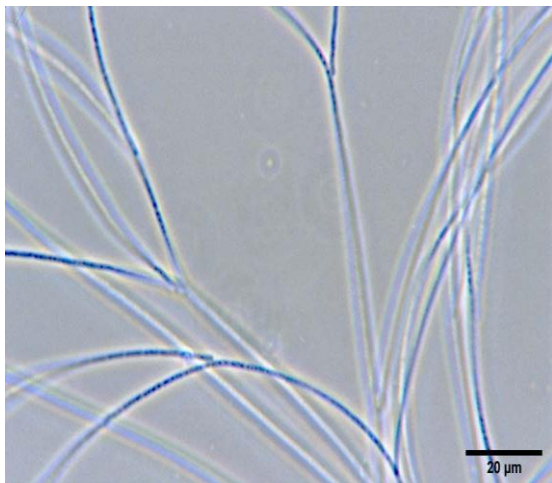


Abbildung 10: *Sphaerotilus natans*, Lebendpräparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de, 2010).



Abbildung 11: *Typ 021N*, Lebendpräparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de, 2010).

Durch Änderung der Abwassergesetze und Fokussierung auf eine zusätzliche Elimination von Stickstoff- und Phosphorverbindungen im Abwasser änderte sich im Laufe der Jahre die Schlammbelastung in Kläranlagen. Um eine ausreichende Nitrifikation zu gewährleisten, wurde vielerorts das Schlammalter erhöht. Folge dieser geänderten Betriebsweise war eine Verschiebung von Hochlastanlagen zu Niedriglastanlagen.

Niedriglastanlagen zeichnen sich im Vergleich zu Hochlastanlagen durch eine besonders niedrige Schlammbelastung mit Werten kleiner 0,15 kg BSB₅/ (kg TS*d) aus. Auch die Bakterienbiozönose verschiebt sich dabei hin zu Niedriglastbakterien (low F/M-Bakterien).

Die Niedriglastbakterien, die hauptsächlich grampositiv sind, verursachen insbesondere bei Temperaturwechseln im Frühjahr bzw. Herbst und häufigem Sauerstoffmangel, die beispielsweise durch lange Denitrifikationsphasen entstehen, Probleme mit Schwimm- und Blähschlamm (Wanner 1994; Jenkins et al. 2004). Vertreter dieser Niedriglastbakterien sind *Microthrix parvicella* (Abbildung 12), *Nostocoida limicola* (Abbildung 13), die Typen 1851, 0092 und 0041/0675 und andere nocardioformen Aktinomyceten (Blackbeard et al. 1986; Casey et al. 1992). Dabei gilt *Microthrix parvicella* auf kommunalen Kläranlagen als Hauptverursacher von Schwimm- und Blähschlamm (Wanner 1994; Jenkins et al. 2004; Martins et al. 2004).



Abbildung 12: *Microthrix parvicella*, Lebendpräparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de, 2010).



Abbildung 13: *Nostocoida limicola*, Lebendpräparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de, 2010).

Neben Sauerstoffmangel gilt auch Substratmangel als Stressfaktor für Niedriglastbakterien. Diese reagieren darauf mit einer Veränderung ihrer Oberfläche beziehungsweise mit der Produktion von oberflächenaktiven Substanzen. Im ersten Fall bilden die Niedriglastbakterien eine hydrophobe Oberfläche aus und erlangen dadurch eine bessere Anhaftung an nährstoffangereicherte Grenzflächen (Slijkhuis 1983; Nielsen et al. 2002). Im zweiten Fall erhöhen die Mikroorganismen durch die Produktion oberflächenaktiver Substanzen die Verfügbarkeit der nicht in Wasser gelösten Substrate. Sie erreichen so beispielsweise ein Emulgieren fettartiger Substanzen, wodurch diese erst für die Bakterien nutzbar werden. Als Nebeneffekt dieser Oberflächenveränderung und der Produktion oberflächenaktiver Substanzen entsteht unter Umständen eine Schaum- beziehungsweise Schwimmschlammsschicht aus flotierten Mikroorganismen. Durch Anlagerung an die

Grenzfläche zwischen Luft und Wasser wird das Platzen von Gasbläschen (CO_2 , O_2 , N_2), welche die Organismen mit nach oben reißen, verhindert. Sie schweben daher an der Oberfläche und bedecken dadurch sogar ganze Belebungsbecken (Abbildung 14) (Lemmer und Kroppenstedt 1984; Lemmer und Baumann 1988; Slijkhuis und Deinema 1988).



**Abbildung 14: SchwimmSchlammdecke auf einem Belebungsbecken (www.zerberus-online.de, 2010).
Durch Anlagerung von Gasbläschen an den Belebtschlamm flotiert der Schlamm an die Wasseroberfläche.**

Trotz der vielen negativen Effekte beziehungsweise Folgen dürfen fädige Bakterien nicht komplett aus Kläranlagen entfernt werden. Auch wenn sie Probleme verursachen können, sind sie für die Abwasserreinigung sinnvoll und im gewissen Maße essenziell. Nur die fädige Struktur der Bakterien erlaubt die typische Flockenausbildung im Belebtschlamm. Die langen, dünnen Fäden (bei *Microthrix parvicella* beträgt der Durchmesser beispielsweise 0,5 bis 0,7 μm) bilden das Rückgrat für den Flockenaufbau und erlauben den Aufwuchs für flockige Bakterien. Die Fäden durchweben letztendlich die Flockenstruktur und halten somit die Bakterien zusammen (Abbildung 15).

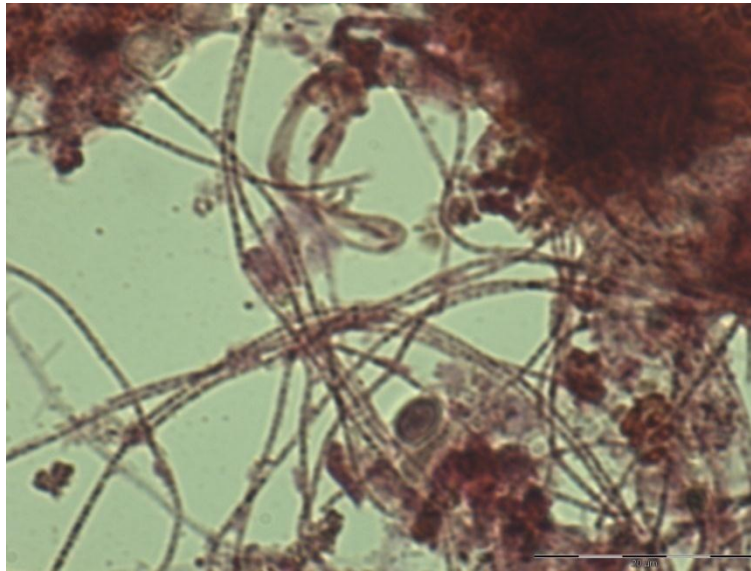


Abbildung 15: Neisserfärbung einer Belebtschlammstruktur, Lebendpräparat, Phasenkontrast. Fädige Organismen dienen als Rückgrat für die Flockenbildung und sind daher trotz der durch sie hervorgerufenen Probleme essenziell für die Belebtschlammbiozönose. (Bild: Knaf)

Probleme mit fädigen Organismen treten erst auf, wenn das Wachstum fädiger Organismen übermäßig stark wird. Dieses übermäßige Wachstum tritt vermehrt im Frühjahr und Herbst bei Temperaturwechseln auf. Dabei verweben sich immer mehr Fäden miteinander und es kommt zur Bildung eines regelrechten Netzwerks. Diese Netzwerkbildung wird auch als Clusterbildung bezeichnet. An das Cluster lagern sich aufgrund der hydrophoben Oberflächenstruktur der Mikroorganismen verschiedene Gasbläschen an. Die Gasbläschen verändern die Dichte der Belebtschlammflocken und reißen die Flocke förmlich mit an die Oberfläche. Wie bereits vorher beschrieben, wird das Platzen der Gasbläschen zusätzlich durch verschiedene Anpassungen des Organismus verhindert und es kommt im schlimmsten Fall zur Ausbildung einer Schwimmschlammdecke. Die Schwimmschlammdecke verhindert dabei den Gasaustausch zwischen Medium und Luft und führt zu Problemen im Nachklärbecken. Der Schlammvolumenindex ISV, welcher die Absetzeigenschaften eines Belebtschlammes beschreibt, nimmt Werte größer 150 ml/g an und der Schlamm kann nur mit Hilfe von Oberflächenräumern vom gereinigten Wasser separiert werden.

Unter Umständen reißen die Gasbläschen die Belebtschlammflocken nicht komplett an die Oberfläche mit, sondern Teile des Belebtschlammes schweben förmlich im Wasser. Die Dichte und der Auftrieb der Flocke entsprechen in diesem Fall ungefähr der Dichte von Wasser. Bei Auftreten solch eines Blähschlammes ist eine Abtrennung zwischen Belebtschlamm und Wasser nicht mehr möglich und es kommt zu einem Schlammabtrieb in den Vorfluter, welcher natürlich möglichst verhindert werden sollte.

Um präzise Bekämpfungsmaßnahmen einleiten zu können, muss zunächst der genaue Verursacher der Bläh- und Schwimmschlammprobleme in der jeweiligen Kläranlage identifiziert werden. Besonders geeignet ist eine mikroskopische Untersuchung mit Lebendbild und verschiedenen Färbemethoden (z. B. Gramfärbung, Neisserfärbung, Kristallviolett färbung) (Eikelboom und van Buijsen 1983; Jenkins et al. 2004). Erst dann kann über die verschiedenen Bekämpfungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Zugabe metallhaltiger Salzlösungen entschieden werden (Wagner 1982). Um keine Probleme auftreten zu lassen, können auch präventive Maßnahme über das gesamte Jahr hinweg durchgeführt werden (z.B. optimiertes Schlammalter). Als wichtige Entscheidungshilfe für die Durchführung präventiver Maßnahmen ist die Kenntnis über den Organismus samt Wachstumseigenschaften, Substratansprüchen und Selektionsvorteilen aber von höchster Bedeutung.

1.3 Der Organismus *Microthrix parvicella*

Microthrix parvicella, als typischer Vertreter der Niedriglastbakterien, gehört zur Gruppe der grampositiven Aktinobakterien. Der Organismus zeichnet sich durch lange, unverzweigte Fäden aus, welche einen Durchmesser von 0,5 bis 0,7 μm besitzen (Abbildung 16).

Bis heute ist eine genaue taxonomische Einteilung von *Microthrix parvicella* in genetische Stammbäume noch nicht vorhanden und verleiht daher dem Organismus vielmehr den Titel eines Kandidats (Blackall et al. 1996). Lediglich 16s rRNA-Fragmente existieren, die beispielsweise bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Verbindung mit der Mikroautoradiographie (MAR) Verwendung finden (Andreasen und Nielsen 1997; Andreasen und Nielsen 1998; Lee et al. 1999; Andreasen und Nielsen 2000).

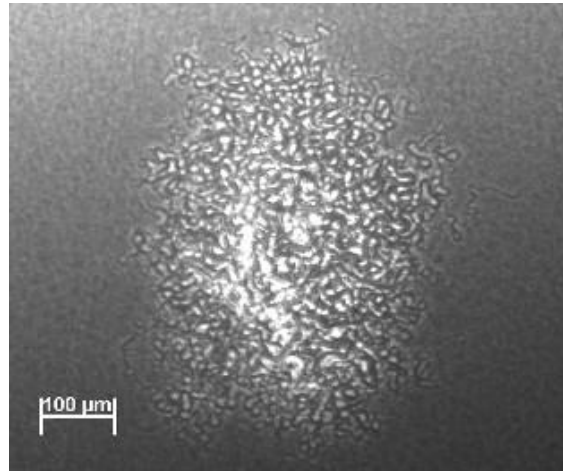


Abbildung 16: Reinkultur von *Microthrix parvicella* (entnommen von der Homepage des Landesamts für Umwelt Bayern, 2011).

1.3.1 Wachstum von *Microthrix parvicella*

Microthrix parvicella zeichnet sich durch ein extrem langsames Wachstum und sehr charakteristische Substratansprüche aus. Die maximale Wachstumsrate unter optimalen Bedingungen beträgt bei 20 °C 0,4 bis 0,7 d⁻¹ (Tandoi et al. 1998). Heterotrophe Mikroorganismen haben zum Vergleich durchschnittlich eine maximale Wachstumsrate von 5,6 d⁻¹ bei 20 °C. Mit fallenden Temperaturen sinkt die maximale Wachstumsrate von *Microthrix parvicella*, wodurch diese bei 7 °C nur noch etwa 0,08 bis 0,12 d⁻¹ beträgt (Rossetti et al. 2002) (Abbildung 17).

Massenhaftes Auftreten trotz teilweise hoher Schlammabzugsraten in Kläranlagen verwundert in Bezug auf die niedrige Wachstumsrate von *Microthrix parvicella*. Es wäre zu erwarten, dass *Microthrix parvicella* durch andere Bakterien mit höheren Wachstumsraten förmlich überwuchert wird. Dies ist jedoch nicht der Fall und kann durch die speziellen Substratansprüche (siehe Kapitel 1.3.2, 1.3.4 und 1.3.5) und mit Hilfe der Monod-Kinetik (siehe Kapitel 1.3.6) erklärt werden. Auch kann das vermehrte Auftreten von Bläh- und Schwimmschlamm besonders im Herbst und Frühjahr bei Temperaturwechseln (Wentzel 1992; Kristensen et al. 1994; Wanner 1994; Kruit et al. 2002; Miana et al. 2002) auf die veränderten Substratverfügbarkeiten zu diesen Zeiten zurückgeführt werden.

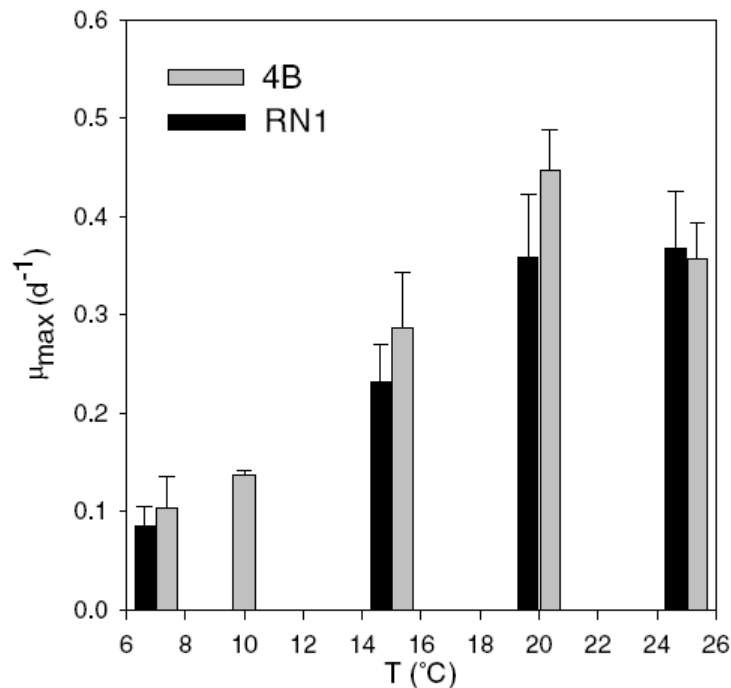


Abbildung 17: Maximale Wachstumsrate von *Microthrix parvicella* als Funktion der Temperatur für die Stämme 4B und RN1 (Rossetti et al. 2002).

1.3.2 Nutzung von Nährstoffen

Auffälligste Besonderheit im Wachstum von *Microthrix parvicella* ist die Nutzung von Kohlenstoff- und Energiequellen. Typische Kohlenstoff- und Energiequellen in Form von Kohlenhydraten wie Glucose oder Fructose werden nicht als Substrat verwendet. Auch einfache organische Säuren wie Milch-, Essig- oder Zitronensäure finden so gut wie keine Verwendung. Hauptkohlenstoffquelle für *Microthrix parvicella* stellen langkettige Fettsäuren mit einem C16- oder C18-Gerüst dar (unter Umständen auch Laurinsäure als gesättigte 12:0 Fettsäure). Typische, von *M. parvicella* verwendete Fettsäuren sind Palmitinsäure (gesättigte 16:0 Fettsäure), Stearinsäure (gesättigte 18:0 Fettsäure) und Ölsäure (ungesättigte 18:1 Fettsäure) (Andreasen und Nielsen 1997; Andreasen und Nielsen 1998; Nielsen et al. 2002). Zusätzlich können auch die Polyoxyethylensorbitan-Derivate (hauptsächlich Tween 40 und Tween 80) der verschiedenen Fettsäuren als Kohlenstoff- und Energiequellen genutzt werden (Van Veen 1973; Slijkhuis 1983; Slijkhuis 1983). Kurzkettige Fettsäuren hingegen können alleinstehend nicht verwendet werden, da *Microthrix parvicella* die Enzyme zum Aufbau langkettiger Fettsäuren fehlen. Bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von kurz- und langkettigen Fettsäuren können die kurzkettigen Fettsäuren aber kurioserweise als Kohlenstoff- und

Energiequelle verwendet werden (Slijkhuis 1983), wobei der genaue Mechanismus dieser Nutzung bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist.

Die Reduktion der Verfügbarkeit langkettiger Fettsäuren in Kläranlagen kann nur durch eine Anpassung des Kläranlagenbetriebs erreicht werden. Während der Zulauf als Quelle langkettiger Fettsäuren mit 14 % - 35 % (Henze et al. 1994; Quémeneur und Marty 1994; Raunkjær et al. 1994) als eher unauffällig angesehen werden kann, liegt die Hauptkohlenstoffquelle von *Microthrix parvicella* vielmehr im hohen Schlammalter des Belebtschlammes begründet. Viele Kläranlagen werden mit einem hohen Schlammalter betrieben, um möglichst wenig Überschussschlamm entsorgen zu müssen. Folge ist jedoch eine ebenfalls hohe Sterberate der Bakterien im Belebtschlamm. Die Zellen lysieren und inkorporierte Fettsäuren werden u.a. aus den Membranen freigesetzt und somit erst verfügbar (Lemmer et al. 2001). Ein hohes Schlammalter ist somit mitverantwortlich für übermäßiges Wachstum von *Microthrix parvicella* (Richard 1989; ATV 2000; Tchobanoglous et al. 2002). Dem Fettsäureeintrag durch Bakterienlyse kann daher nur durch konstanten Überschussschlammabzug und daraus resultierenden, niedrigen Schlammaltern entgegengewirkt werden.

Die spezielle Kohlenstoffnutzung ist nicht das einzige charakteristische Merkmal von *Microthrix parvicella*. Auch die Nutzung von Stickstoff- und Schwefelverbindungen grenzt den Organismus von anderen Bakterien ab. Als Stickstoffquelle dienen hauptsächlich reduzierte Verbindungen wie beispielsweise Ammonium (Casey et al. 1999). Die Minimierung der Ammoniumverfügbarkeit für *Microthrix parvicella* in Kläranlagen ist jedoch kaum umsetzbar. Ammonium bildet die Hauptform des eingetragenen Stickstoffs in kommunalen Kläranlagen. Die Ammonifikation, d.h. die Umwandlung von Harnstoff zu Ammonium, und lange Verweilzeiten im Kanalnetz führen dazu, dass Stickstoff vorwiegend in seiner reduzierten Form als Ammonium im Zulauf vorliegt. Die Nutzung des Ammoniums aus dem Zulauf durch *M. parvicella* kann also praktisch nicht verhindert werden.

Eine weitere Ammoniumquelle in Kläranlagen ist das sogenannte Prozesswasser. Prozesswasser entsteht bei der Pressung von Belebtschlamm und ist gekennzeichnet durch sehr hohe Ammoniumkonzentrationen. Das entstandene Prozesswasser wird der Belebung stoßweise oder in geringen Mengen konstant zugeführt. Dadurch steigt natürlich die Ammoniumverfügbarkeit für *Microthrix parvicella* im Belebungsbecken.

Neben der Nutzung von Ammonium zeichnet sich der Organismus auch als Nitratreduzierer aus, wobei Nitrat nicht weiter als Nitrit reduziert werden kann (Tandoi et al. 1998). Als Schwefelquelle werden wie bei den Stickstoffquellen hauptsächlich reduzierte Verbindungen

genutzt. Hauptschwefelquelle bildet dabei L-Methionin, welches als essenziell für das Wachstum fädiger Organismen angesehen werden muss. Die Rolle von L-Methionin als Aminosäure ist für das Wachstum von *Microthrix parvicella* dabei aber weniger entscheidend als vielmehr seine Rolle als reduzierte Schwefelverbindung.

1.3.3 Temperaturabhängigkeit und pH-Wert-Optimum

Wie bereits beschrieben ist das Wachstum von *Microthrix parvicella* temperaturabhängig. Das Temperaturoptimum für das Wachstum liegt bei 25 °C. Bei Temperaturen von 7 °C besitzt der Organismus jedoch immer noch die Fähigkeit zu wachsen, auch wenn die Wachstumsrate sehr gering ist (Slijkhuis 1983; Tandoi et al. 1998). Der Hauptidelektionsvorteil bei niedrigen Temperaturen gegenüber flockenbildenden Bakterien im Belebtschlamm liegt in der schlechteren Fettlöslichkeit begründet. Die verschiedenen Fettsäuren lagern sich auf der Wasseroberfläche ab und können dort von den fädigen Organismen besser genutzt werden. Dazu bildet *Microthrix parvicella* beispielsweise hydrophobe Oberflächen aus oder produziert oberflächenaktive Substanzen (Slijkhuis 1983; Nielsen et al. 2002). Die Substratverfügbarkeit steigt somit mit sinkenden Temperaturen. Bei der Betrachtung des pH-Optimums für das Wachstum fallen keine Besonderheiten auf. *M. parvicella* zeigt gutes Wachstum bei neutralen pH-Werten, d.h. in einem Bereich von pH 6,7 bis pH 8,0 (Slijkhuis 1983; Tandoi et al. 1998).

1.3.4 Mikroaerophilie

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von *Microthrix parvicella* ist der Bedarf an Sauerstoff. Der Organismus zählt zu den mikroaerophilen Bakterien (Slijkhuis 1983; Tandoi et al. 1998), welche allesamt niedrige Sauerstoffkonzentrationen bevorzugen. Eine ausreichende Entwicklung der fädigen Bakterien kann somit auch bei lang anhaltenden anoxischen Bedingungen beobachtet werden, wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff kleiner 2 mg/l ist (Slijkhuis und Deinema 1988; Madoni und Davoli 1993; Ekama et al. 1996). Der Einfluss der Mikroaerophilie wurde untersucht, um gezielte Maßnahmen gegen *Microthrix parvicella* aufgrund veränderter Sauerstoffverfügbarkeit hervorzurufen (Slijkhuis und Deinema 1988). Dabei wurde beobachtet, dass sich die Morphologie der Fäden bei

steigenden Sauerstoffkonzentrationen ändert. Sauerstoffkonzentrationen von 0,4 mg/l führen dabei zu langen, regulär entwickelten Filamenten. Bei dauerhaften Konzentrationen von über 2 mg/l liegen die Zellen hingegen leer und verformt vor (Rossetti et al. 2005). Versuche mit Sauerstoffkonzentrationen dauerhaft über 6 mg/l führten sogar zu toxischen Effekten (Slijkhuis 1983). Bei den durchgeführten Versuchen zur Sauerstoffempfindlichkeit von *Microthrix parvicella* handelte es sich jedoch um Versuche in Laborreaktoren. Sauerstoffkonzentrationen dauerhaft über 2 mg/l geschweige denn 6 mg/l sind in Belebungsbecken von Kläranlagen nicht realistisch. Zum einen ist zur Elimination von Stickstoffverbindungen der Wechsel zwischen unbelüfteten und belüfteten Phasen notwendig und andererseits wären hohe Sauerstoffkonzentrationen mit einem großen Energiebedarf verbunden.

1.3.5 Nutzung und Speicherung von Lipiden

Als weitere Besonderheit besitzt *Microthrix parvicella* die Fähigkeit, Lipide nicht nur unter aeroben und anoxischen Bedingungen aufzunehmen und zu speichern, sondern auch unter langen anaeroben Phasen (Slijkhuis 1983; Rossetti et al. 1997; Tandoi et al. 1998; Rossetti et al. 2002). Dies erlaubt dem Organismus auch langanhaltende Stressphasen ohne Sauerstoff zu überstehen und diese sogar zu seinem Vorteil zu nutzen (Nielsen et al. 2002; Rossetti et al. 2002). Flockenbildende Bakterien besitzen hingegen die Fähigkeit der anaeroben Lipidspeicherung nicht und sind daher unter diesen Stressbedingungen den fädigen Organismen unterlegen (Rossetti et al. 2005).

Die Aufnahme der Lipide durch *Microthrix parvicella* erfolgt direkt durch den Organismus oder durch vorausgehende Adsorption an die Flockenstruktur. Die gespeicherten Substrate können aber erst genutzt werden, wenn wieder Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptoren vorhanden sind, d.h. erst nach Ende der anaeroben Stressphase. Der Speichervorteil fädiger Organismen im Vergleich zu flockenbildenden Bakterien verstärkt sich zusätzlich bei niedrigen Temperaturen. Bei sinkenden Temperaturen kann eine gesteigerte Akkumulation von Polyhydroxybuttersäure beobachtet werden, die dann als Energiequelle genutzt werden kann. Dies würde ebenfalls die Dominanz fädiger Organismen bei Temperaturwechseln im Frühjahr und Herbst (Wanner 1994) erklären, da durch bessere Reservestoffspeicherung Stressphasen mit Sauerstoff- und Substratmangel besser überstanden werden können. Die Theorie der erhöhten Polyhydroxybuttersäureakkumulation bei niedrigen

Temperaturen ist jedoch umstritten. Während Arbeitsgruppen eine Akkumulation von Polyhydroxybuttersäure nachweisen konnten (jedoch erst bei Verweilzeiten größer 24 Stunden im anaeroben Milieu), widerlegten andere Versuche diese Akkumulationshypothese mittels Mikroautoradiographieexperimenten.

1.3.6 Monod-Kinetik nach Chudoba et al.

Eine anerkannte Erklärung für die überwiegende Entwicklung fädiger Organismen in Kläranlagen ist die Monod-Kinetik beziehungsweise die Tatsache, dass die filamentösen Bakterien eher den k-Strategen zugeordnet werden können, während die flockenbildenden Bakterien vielmehr zu den r-Strategen gehören. Die in nachfolgender Formel beschriebene Monod-Kinetik gründet auf Arbeiten von Chudoba et al. aus dem Jahre 1973 und beschreibt die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der vorliegenden Substratkonzentration.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_s}{k_s + c_s}$$

Die Wachstumsrate μ wird mit Hilfe der Monod-Formel durch die maximale Wachstumsrate μ_{max} und einem Term, der sich aus der Substratkonzentration c_s und der Sättigungskonstante des Organismus k_s zusammensetzt, bestimmt. Die Sättigungskonstante steht dabei im Zusammenhang mit der Affinität zum Substrat. Je niedriger die Sättigungskonstante, desto höher die Affinität des Organismus zum Substrat.

Bei der Monod-Kinetik können drei Fälle auftreten:

1. Fall: $c_s < k_s \rightarrow \mu = \mu_{max} / k_s$
2. Fall: $c_s = k_s \rightarrow \mu = \mu_{max} / 2$
3. Fall: $c_s > k_s \rightarrow \mu = \mu_{max}$

Im ersten Fall ist die Substratverfügbarkeit stark limitiert. Daraus resultiert, dass die Wachstumsrate hauptsächlich durch die Substrataffinität des Organismus beschrieben wird. Je größer die Substrataffinität, desto kleiner der Nenner in der Monod-Formel und entsprechend größer die Wachstumsrate. Im zweiten Fall entspricht die Sättigungskonstante der Substratkonzentration. In diesem Fall wäre die Wachstumsrate die halbe maximale

Wachstumsrate. Diese spezielle Konzentration wird auch Halbsättigungskonzentration genannt. Im dritten Fall ist die verfügbare Substratkonzentration größer als die Sättigungskonstante. Das Wachstum tendiert somit gegen die maximale Wachstumsrate, da keine Substratlimitierung vorhanden ist.

Wie bereits beschrieben gehören *Microthrix parvicella* und die anderen filamentösen Bakterien in Belebtschlammanlagen zu den sogenannten k-Strategen. Diese wachsen typischerweise eher langsam und besitzen niedrige k_s -Werte, d.h. sie haben eine hohe Substrataffinität (Wanner 1994; Jenkins et al. 2004). Die flockenbildenden Organismen gehören hingegen zu den r-Strategen, welche höhere k_s -Werte als die filamentösen Bakterien aufweisen. Daraus ergeben sich unterschiedliche Selektionsvorteile in Abhängigkeit der Substratverfügbarkeit (s. Abbildung 18).

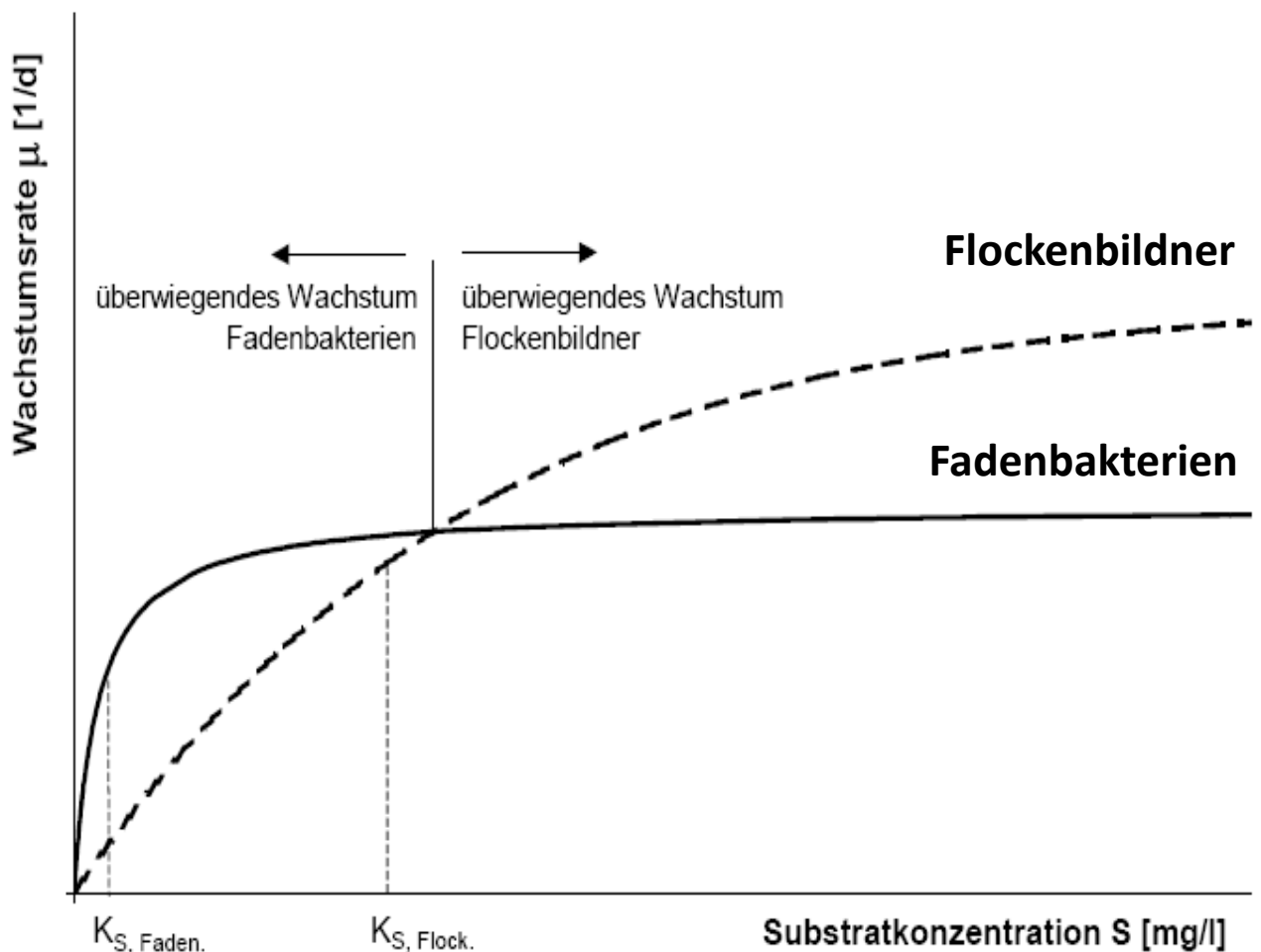


Abbildung 18: Abhängigkeit der Wachstumsrate flockiger und fädiger Organismen von der Substratkonzentration nach Chudoba et al, 1973. Fadenbakterien zeigen aufgrund ihrer höheren Substrataffinität Wachstumsvorteile bei niedriger Substratverfügbarkeit.

Wie man in Abbildung 18 erkennt, kommt es je nach verfügbarer Substratkonzentration zu einem überwiegenden Wachstum flockiger beziehungsweise fädiger Organismen. Flockige Organismen besitzen eine höhere maximale Wachstumsrate und eine höhere Sättigungskonstante als fädige Organismen. Dies hat zur Folge, dass die Entwicklung flockiger Organismen bei Überschreitung einer gewissen Substratkonzentration gegenüber der Entwicklung fädiger Organismen überwiegt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen, also bei Substratlimitierung, tritt der erste Fall der Monod-Kinetik ein. Die Wachstumsrate hängt hauptsächlich von der Substrataffinität ab, wodurch sich fädige Bakterien mit niedrigen k_s -Werten besser entwickeln als flockige Organismen mit hohen k_s -Werten. Die hohe Substrataffinität der fädigen Organismen ist dabei Folge eines besseren Oberflächen-Volumen-Verhältnisse im Vergleich zu den flockigen Bakterien.

Die mit der Monod-Kinetik erklärable, überwiegende Entwicklung fädiger Organismen bei Substratlimitierung ist in Kläranlagen häufig der Fall. Die Kläranlagen werden als Niedriglastanlagen betrieben, wodurch die Schlammbelastung und somit die Substratverfügbarkeit in Bezug auf die Trockensubstanz relativ gering ist. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde versucht, durch Reaktoren mit Substratgradienten (sogenannte plug-flow-Reaktoren) die Substratkonzentration konstant hochzuhalten. Der gewünschte Erfolg blieb dabei aber größtenteils aus.

1.3.7 Weitergehende Bekämpfungsmaßnahmen von *Microthrix parvicella*

Geänderte Betriebsführungen und konsequenter Abzug der Schwimmschlammdecken führen nicht immer zum erwarteten Erfolg gegen übermäßiges Wachstum von *Microthrix parvicella*. Das Wachstum kann zwar verringert werden, aber dennoch können Probleme mit Schwimm- und Blähschlamm weiter bestehen bleiben. Zur kurzfristigen Bekämpfung bei akuten Problemen mit dem Belebtschlamm werden daher Flockungs- und Fällungsmittel eingesetzt. Die wirkungsvollsten Flockungs- und Fällungsmittel sind dabei Metalllösungen auf Basis von Eisen- und Aluminiumsalzen (Eikelboom 1997; Roels et al. 2002). Alternativ werden auf einigen Kläranlagen Silikate oder Betonite verwendet.

Metallsalze zeigen die besten Resultate bei der Schwimm- und Blähschlammeseitigung, enthalten aber auch durch Verunreinigungen nicht zu unterschätzende Konzentrationen an Schwermetallen. Diese Verunreinigungen sind dem Produktionsprozess in der Eisen- und

Bauxitverarbeitung geschuldet, bei dem die stark sauren ($\text{pH} < 1$) Flockungs- und Fällungsmittel als Abfallprodukt anfallen.

Zusätzlich zu den anorganischen Flockungsmitteln finden in der Abwasserbehandlung Polymere Verwendung. Sie reduzieren den Bedarf an anorganischen Flockungsmitteln, fördern ein schnelleres Wachstum von größeren Flocken und führen letztendlich zu einer verbesserten Reinigungsleistung. Die üblichsten Formen basieren dabei auf Acrylamiden, die jedoch Nachteile und Gefahren aufgrund ihrer schlechten Abbaubarkeit und ihrer hohen Toxizität nach sich ziehen.

1.4 Die biologische Membran

1.4.1 Aufbau einer biologischen Membran

Der untersuchte Organismus *Microthrix parvicella* gehört zu der Gruppe der grampositiven Aktinobakterien. Bis heute ist der Organismus jedoch noch nicht genau taxonomisch eingeordnet. Es ist daher nicht bekannt, ob *M. parvicella* ein Vertreter der Mycolata mit ihrer typischen Mycolsäureschicht ist. Nielsen und Kollegen konnten aber in ihren Untersuchungen zeigen, dass *Microthrix parvicella* zumindest eine hydrophobe Zellwand besitzt (Nielsen et al. 2002). Dazu nutzen sie die microspheres adhesion to cells Methode (MAC) in Kombination mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

Generell lassen sich Bakterien aufgrund ihres Zellwandaufbaus und den damit verbundenen Färbereaktionen während der Gramfärbung in drei unterschiedlichen Gruppen einteilen – gramnegative Bakterien, grampositive Bakterien und grampositive, mycolsäurehaltige Bakterien (Eikelboom und van Buijsen 1983; Jenkins et al. 2004). Allen drei Gruppen gemein ist eine innere Membran, die sogenannte Cytoplasmamembran. Sie grenzt das Zellinnere, das Cytoplasma, vom Außenmilieu ab und dient somit als physikalische Barriere. Die Cytoplasmamembran ist zusätzlich an unterschiedlichen Prozessen wie Energiegewinnung, Zellwachstum und Substrattransport beteiligt. Die zweite Komponente der Zellhülle, die Zellwand, ist für Form und Festigkeit der Zelle verantwortlich. Sie garantiert das Aufrechterhalten enormer osmotischer Drücke durch gelöste Stoffe in der Zelle und schützt somit die Zelle. Neben der Cytoplasmamembran besitzen Bakterien unterschiedlich dicke Peptidoglykanschichten (Mureinschichten). Die Peptidoglykanschicht setzt sich aus β -1,4-

glykosidisch verknüpften Zuckerderivaten zusammen. Um die Peptidoglykanschicht neben der Cytoplasmamembran auszubilden, werden die Glykanketten durch Peptidbindungen von verschiedenen Aminosäuren quervernetzt. Besonders die Anzahl der Quervernetzungen zwischen den verschiedenen Ketten ist dabei für die Starrheit der Peptidoglykanschicht verantwortlich.

Grampositive und gramnegative Bakterien unterscheiden sich nun hauptsächlich durch unterschiedlich starke Peptidoglykanschichten und durch eine zusätzliche Barriere bei gramnegativen Bakterien, der sogenannten Außenmembran.

Gramnegative Bakterien besitzen eine vergleichsweise dünne, meist einschichtige Peptidoglykanschicht. Zusätzlich ist jedoch eine weitere Barriere, die Außenmembran, auf die Peptidoglykanschicht aufgelagert (Nikaido und Nakae 1979). Durch diese zusätzliche Schicht entsteht zwischen äußerer und innerer Membran der periplasmatische Raum, der für verschiedene Stoffwechselprozesse essenziell ist. Die zusätzliche äußere Membran besteht aus Phospholipiden, verschiedenen Proteinen und Lipopolysacchariden. Charakteristikum für die Außenmembran gramnegativer Bakterien sind dabei eingelagerte Proteine (Porine), die für den Stoffaustausch hydrophiler Solute über die sonst impermeable, hydrophobe Außenmembran verantwortlich sind.

Die einschichtige Peptidoglykanschicht und die aus Lipiden aufgebaute Außenmembran sind ausschlaggebend für ein verändertes Färbeverhalten gramnegativer Bakterien im Vergleich zu grampositiven Bakterien. Die Zugabe von Ethanol im Gramfärbeprozess wirkt lipidlösend und legt somit die dünne Peptidoglykanschicht der gramnegativen Bakterien frei. Der Farbstoff kann nicht mehr ausreichend zurückgehalten werden und das Bakterium wird entfärbt. Ein Gegenfärben mit roten Farbstoffen lässt somit gramnegative Bakterien im Mikroskop rot erscheinen (Stryer et al. 2003).

Grampositive Bakterien besitzen eine sehr dicke Peptidoglykanschicht, die auf der Cytoplasmamembran aufgelagert ist. Die Peptidoglykanschicht ist dabei mit unterschiedlichen, negativ geladenen Teichon- und Lipoteichonsäuren durchzogen. Eine Außenmembran wie bei gramnegativen Bakterien ist nicht vorhanden. Grampositive Bakterien erscheinen nach der Gramfärbung dunkelblau, da die Peptidoglykanschicht die Extraktion des ethanollöslichen, basischen Farbstoffes beim Färbeprozess verhindert und die Zellwand somit blau gefärbt bleibt. Eine Gegenfärbung mit roten Farbstoffen führt dabei teilweise zu einem zusätzlichen Violettschimmer (Stryer et al. 2003).

Eine Zwischengruppe bei der Einteilung grampositiver und gramnegativer Bakterien bilden die mycolsäurehaltigen Bakterien (Mycolata). Sie werden zwar generell den grampositiven

Bakterien zugeordnet, besitzen aber wie die gramnegativen Bakterien eine zusätzliche äußere Barriere. Aufgelagert auf die Peptidoglykanschicht bildet eine Schicht aus Mycolsäuren eine Permeabilitätsschranke, funktionell vergleichbar mit der Außenmembran gramnegativer Bakterien. Um den Austausch von in Wasser gelösten Stoffen durch diese hydrophobe Mycolsäureschicht zu ermöglichen, besitzt diese spezielle Gruppe der grampositiven Bakterien wie die gramnegativen Bakterien in die Permeabilitätsbarriere eingelagerte Porine. Abbildung 19 zeigt noch einmal zusammenfassend den Vergleich der Zellhüllen grampositiver und gramnegativer Bakteriengruppen.

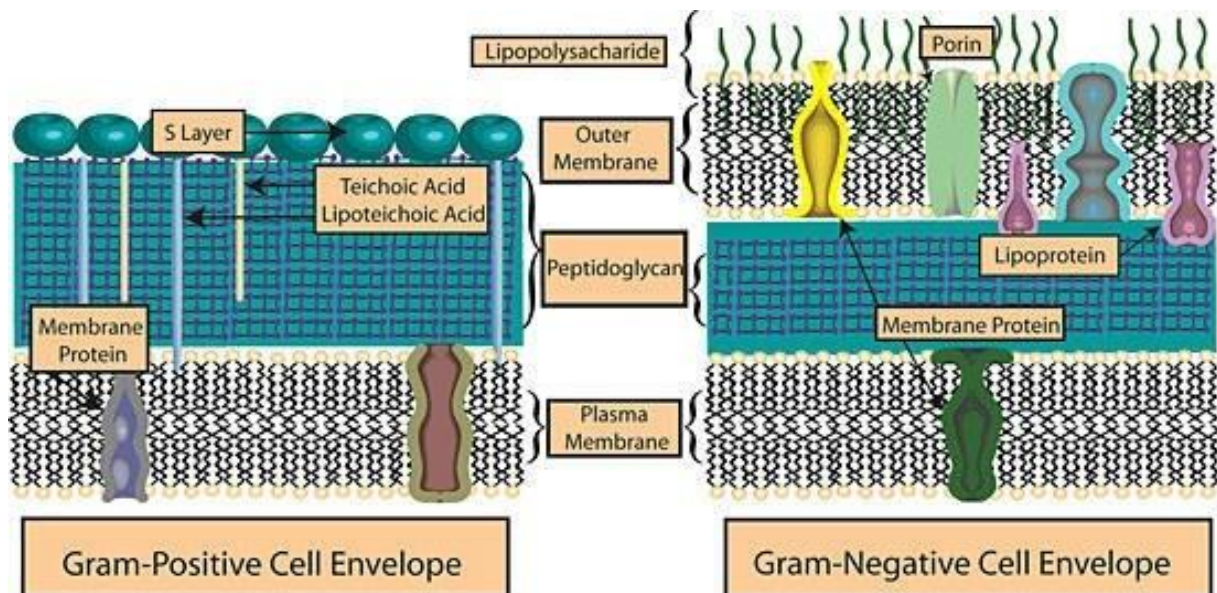


Abbildung 19: Vergleich des Zellhüllenaufbaus grampositiver und gramnegativer Bakterien. Gramnegative Bakterien besitzen im Vergleich zu den grampositiven Bakterien eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere und nur eine dünne Peptidoglykanschicht. (von <http://www.cals.cornell.edu/cals/micro/research/labs/angert-lab/images/cellwall1.jpg>, 2012)

Zum genauen Verständnis der Funktion von Membranen muss zunächst deren Aufbau genauer betrachtet werden. Eine Membran ist aufgebaut aus einer dynamischen Lipiddoppelschicht, dem Bilayer, in der verschiedene funktionelle Proteine eingebettet sind. Die Lipiddoppelschicht erzeugt eine Abgrenzung der Zellen zum umgebenden Medium und verhindert den unkontrollierten Transport von Stoffen in beziehungsweise aus der Zelle heraus. Die Selektivität der Membranpermeabilität wird durch die verschiedenen Membranproteine erzeugt. Sie bilden Kanäle zur spezifischen Aufnahme und Abgabe von Stoffen oder sind für verschiedene Transportsysteme zum Beispiel in Form von Pumpen

verantwortlich (Madigan et al. 2001). Gleichzeitig dient die Membran der Vermittlung von Informationen und der Speicherung von Energie.

Die Lipiddoppelschicht besteht aus speziell ausgerichteten Membranlipiden mit amphiphilem Charakter (Abbildung 20). Sie besitzen einen hydrophilen (wasserliebenden) Kopf, der mit einem hydrophoben (wasserabweisenden), aus Fettsäuren aufgebautem Schwanz verbunden ist. Durch den amphiphilen Charakter der Membranlipide kommt es im wässrigen Milieu zu einer energetisch günstigen Ausbildung einer bimolekularen Schicht. Die hydrophoben Schwänze weisen dabei ins Membraninnere, die hydrophilen Köpfe zeigen zum wässrigen Medium hin.

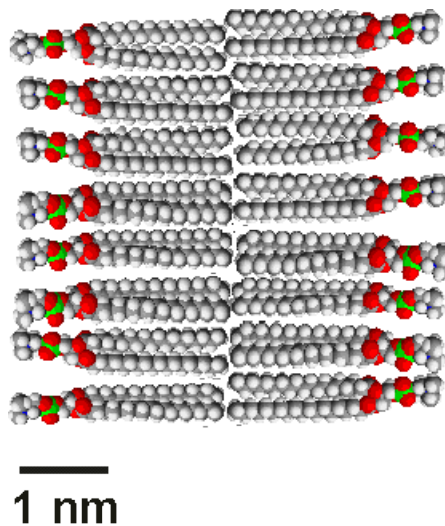


Abbildung 20: Aufbau und Dimension einer Lipidmembran (entnommen von www.uni-stuttgart.de, 2011). Die Lipide zeigen einen charakteristischen, amphiphilen Aufbau mit einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz aus Fettsäuren.

Unterschieden wird bei den Membranlipiden zwischen Phospholipiden (Abbildung 21) Glykolipiden (Abbildung 22) und Cholesterinen (Abbildung 23).

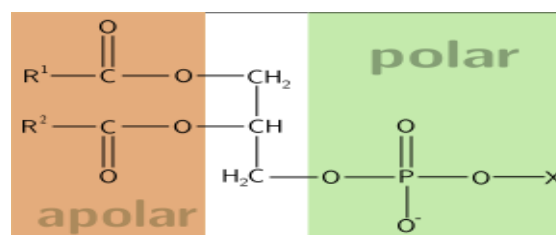


Abbildung 21: Allgemeine Struktur der Phosphoglyceride. Die Reste R1 und R2 bestimmen die Fettsäuren, der Rest X bestimmt die Klasse (www.wikipedia.org, 2011).

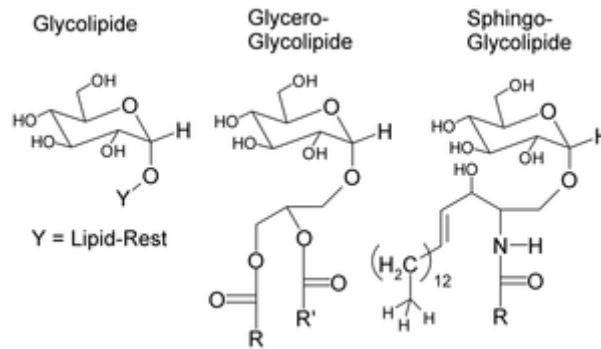


Abbildung 22: Struktur der Glykolipide sowie der Untergruppen Glycero- und Sphingo-Glykolipide (www.wikipedia.org, 2011).

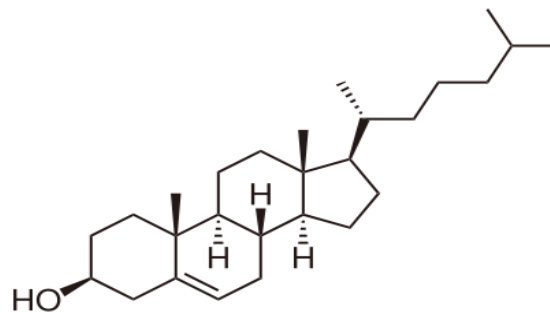


Abbildung 23: Struktur von Cholesterinen (Cholesterol) (www.wikipedia.org, 2011).

Die Mehrzahl der Membranlipide kann der Gruppe der Phospholipide zugeordnet werden. Diese bestehen aus Fettsäuren, einer Ankerregion und einer Phosphatgruppe mit angebundenem Alkohol. Die hydrophoben Eigenschaften der Lipide basieren dabei auf den Fettsäuren, während die hydrophilen Eigenschaften durch die restlichen Komponenten des Kopfes bestimmt werden. Zu den Phospholipiden zählt beispielsweise das in der Black Lipid Bilayer-Technik verwendete Phosphatidylcholin (PC).

Glykolipide gehören zur Gruppe der kohlenhydrathaltigen Lipide. Sie sind Teil der phosphorfreen Struktur lipide, bei denen Mono- oder Oligosaccharide glykosidisch an Lipidmoleküle gebunden sind. Die Glykolipide sind asymmetrisch in der Membran angeordnet, wobei sie ausschließlich auf der Außenseite der Lipiddoppelschicht liegen.

Die Cholesterine als dritte Gruppe der Membranlipide gehören zur Gruppe der Sterole. Ein Schwanz aus Kohlenwasserstoffen ist dabei an eine Hydroxylgruppe angelagert, wodurch die Cholesterine wesentlich zur Stabilität der Membran beitragen.

1.4.2 Das Flüssig-Mosaik-Modell

Das bis heute anerkannte Flüssig-Mosaik-Modell zur Anordnung und Organisation von biologischen Membranen basiert auf den Arbeiten von Singer und Nicolson (Singer und Nicolson 1972). Sie beschreiben dabei die biologische Membran als Lipiddoppelschicht aus zweidimensionalen Lösungen gerichteter Lipide und globulärer Proteine. Den Lipiden und Proteinen kommen dabei unterschiedliche Rollen und Eigenschaften zu. Die Lipiddoppelschicht kann als Lösungsmittel für Membranproteine dienen, aber auch als Permeabilitätsbarriere zum umgebenden Medium. Die Lipide innerhalb der Doppelschicht können frei lateral diffundieren, solange keine spezifischen Wechselwirkungen dies unterbinden (Abbildung 24). Die transversale Diffusion der Lipide, d.h. die Wanderung von einer Membranoberfläche zur anderen Oberfläche, findet hingegen seltener und auch langsamer statt. Diese seltene Wanderung wird auch als Flip-Flop bezeichnet und ermöglicht den Austausch von Lipiden zwischen den beiden Schichten (Abbildung 25).

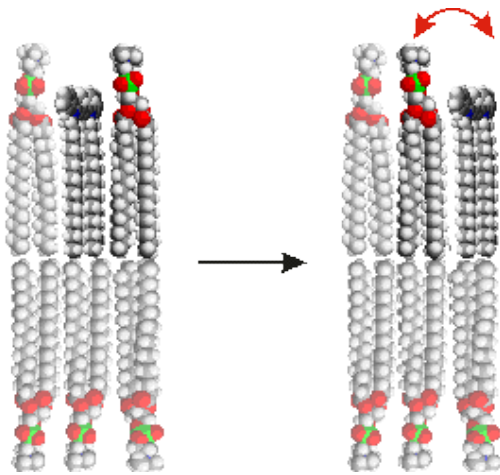


Abbildung 24: Laterale Diffusion von Membranlipiden ($v = 10^{-7}$ s). Ermöglicht den Austausch von Lipiden innerhalb einer Schicht. (http://www.uni-stuttgart.de/bio/bioinst/biophysik/lehre/skripte/physikalisch_technische_methoden/pdf/versuch_7.pdf, 2011)

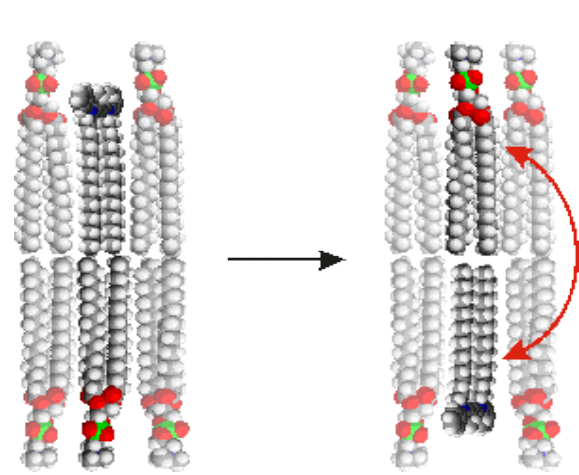


Abbildung 25: Transversale Diffusion von Membranlipiden ($v \gg 1$ d). Ermöglicht den Austausch von Lipiden zwischen den Schichten. (http://www.uni-stuttgart.de/bio/bioinst/biophysik/lehre/skripte/physikalisch_technische_methoden/pdf/versuch_7.pdf, 2011)

Die Fluidität der Membran wird hauptsächlich durch die Zusammensetzung der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Membranlipide bestimmt. Hohe Konzentrationen an Cholesterinen führen beispielsweise zu einer höheren Viskosität der Membran. Gleichzeitig hängt die Starrheit der Membran von der Temperatur ab, wodurch abrupte Übergänge zwischen flüssigen und starren Zuständen in Abhängigkeit von der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen der Membranlipide hervorgerufen werden können. Bei physiologischen Temperaturen liegt die Membran im flüssig-kristallinem Zustand vor.

Weiterhin beschreibt das Flüssig-Mosaik-Modell von Nicholson und Singer die Symmetrie von biologischen Membranen. Demnach sind alle biologischen Membranen asymmetrisch aufgebaut, was sich besonders durch unterschiedliche Bestandteile und Enzymaktivitäten an den äußeren und inneren Oberflächen äußert (Singer und Nicolson 1972).

Wie in Abbildung 26 erkennbar, ist die flüssig-kristalline Lipiddoppelschicht mit Proteinen durchzogen. Dabei unterscheidet man hauptsächlich zwischen peripheren und integralen Proteinen. Periphere Proteine durchziehen nicht die komplette Membran, sondern sind nur über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken mit der Membran verbunden. Sie lassen sich somit leicht lösen. Einige periphere Membranproteine sind an integrale Proteine gekoppelt. Diese Koppelung kann dabei auf der cytosolischen oder extrazellulären Membranseite stattfinden. Bei anderen peripheren Membranproteinen findet die Bindung beispielsweise über eine Fettsäure statt. Im Gegensatz zu den peripheren Membranproteinen durchziehen integrale Membranproteine die Membran vollständig und stehen daher in intensiver Wechselwirkung zu den Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht.

Die integralen und peripheren Membranproteine haben unterschiedliche Aufgaben. Sie spielen eine Rolle beim Transport unterschiedlicher Stoffe (z.B. Porine, ABC-Transporter), sind Teil der Signalübertragung und Zell-Zell-Erkennung oder agieren beispielsweise als Lichtrezeptoren (z.B. Rhodopsin) (Madigan et al. 2001).

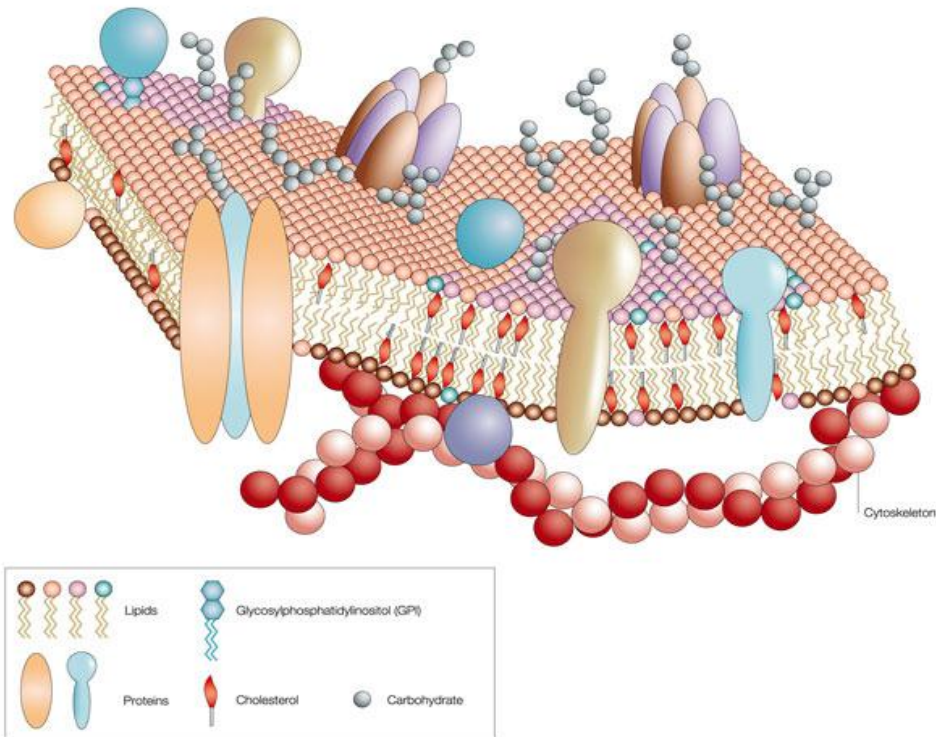


Abbildung 26: Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran gemäß Singer und Nicolson.

(http://www.nature.com/horizon/livingfrontier/background/images/membrane_f2.jpg, 2011)

1.4.3 Porenformende Proteine (Porine)

Die Porine gehören zu den integralen Membranproteinen und dienen dabei dem Durchlass von in Wasser gelösten Substanzen durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht. Porine bestehen aus einer Kette von Aminosäuren (320-400 Aminosäuren lang), die zu einem mehrsträngigen, antiparallelen β -Fass (β -barrel) gefaltet ist (Abbildung 27). Die Engstelle im Innern des Porins legt dabei die Durchlasseigenschaften der Pore fest.

Bei den Porinen wird zwischen allgemeinen Diffusionsporen und Porinen mit spezifischen Bindestellen unterschieden.

Allgemeine Diffusionsporen sind mit Wasser gefüllte Kanäle, welche Moleküle und Stoffe nur in Anhängigkeit ihrer Größe selektieren und passieren lassen. Moleküle und Stoffe, die größer als die Engstelle des Kanals sind, können nicht durch den Kanal diffundieren. Nur kleinere Moleküle und Stoffe können den Kanal passieren. Daher ist bei Diffusionsporen ein diffusionskontrollierter Fluss zu beobachten. Der Fluss durch die Membran steigt linear mit

der verfügbaren Substratkonzentration. Beispiele für allgemeine Diffusionsporen sind die Außenmembranproteine OmpC und OmpF von *Escherichia coli*.

Porine mit spezifischen Bindestellen hingegen zeigen hohe Flussraten bei niedrigen Substratkonzentrationen. Sie begünstigen dabei den Transport spezifischer Moleküle oder Stoffe, die an spezielle Bindestellen innerhalb des Kanals binden können. Diese Bindung im Kanal erleichtert die Diffusion dieser Stoffe und ermöglicht so deren effektive Aufnahme (Benz und Bauer 1988; Nikaido 2003; Benz und Orlik 2004). Bindestellen sind für die unterschiedlichsten Stoffe bekannt. So konnten Porine mit Bindestellen unter anderem für Zucker (LamB von *Escherichia coli*) (Benz et al. 1987), Phosphate (PhoE von *Escherichia coli*) (Hancock und Benz 1986) und Antibiotika nachgewiesen werden (Benz et al. 1988).

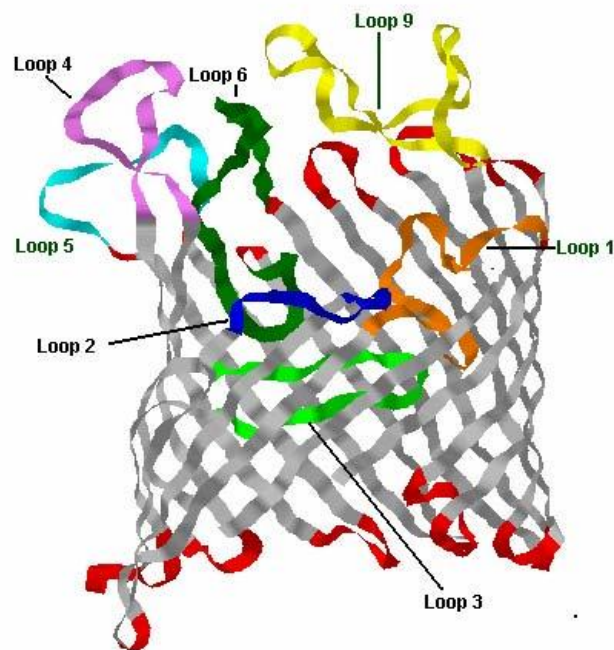


Abbildung 27: Seitenansicht eines LamB- Monomers (Maltoporin). Die β -Stränge sind grau dargestellt, die Wendungen zwischen zwei β -Strängen rot. Externe Schleifen sind verschieden farbig dargestellt und durchnummeriert. (aus <http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/fileadmin/REPORT/BIOTE/biote015.htm>, 2012)

Ein Vergleich der Fließgeschwindigkeiten von Diffusionsporen und Poren mit Bindestelle in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ist in nachfolgender Abbildung 28 dargestellt. Dabei erkennt man, dass die Aufnahmegeschwindigkeit der Porine mit Bindestelle bei niedrigen Substratkonzentrationen höher ist als bei allgemeinen Diffusionsporen. Erst bei

Überschreiten einer gewissen Substratkonzentration ist ein allgemeines Diffusionsporin einem Porin mit Bindestelle in Bezug auf die Flussgeschwindigkeit überlegen.

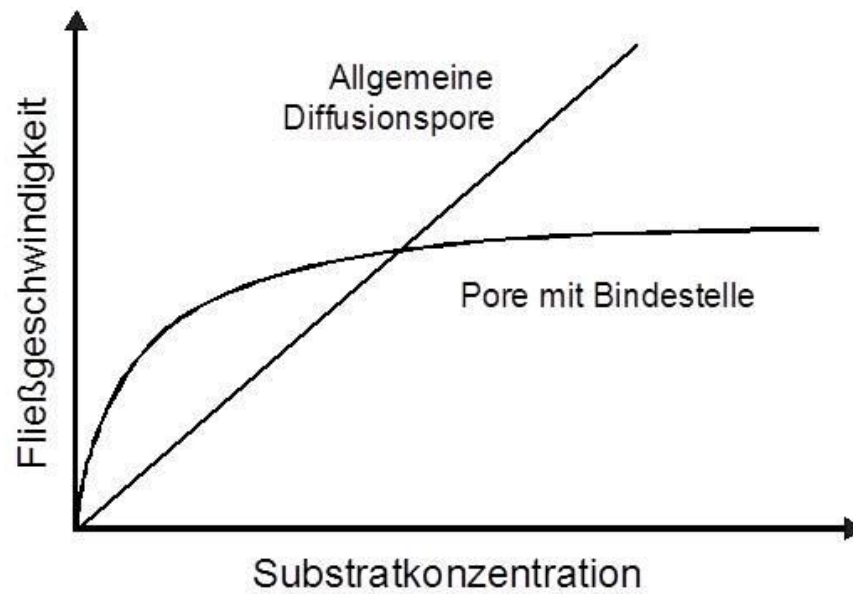


Abbildung 28: Vergleich der Fließgeschwindigkeiten bei allgemeinen Diffusionsporen und Poren mit Bindestellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (aus <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2009/3891/pdf/klaecktadiss.pdf>, 2012)

2 ZIEL/MOTIVATION DER ARBEIT

Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaumbildung, hauptsächlich verursacht durch *Microthrix parvicella*, führen seit Jahren zu massiven Betriebsprobleme auf kommunalen Kläranlagen. Bis heute konnte keine erfolgreiche Methode gefunden werden, welche die Problematik des unzureichenden Schlammabsetzverhaltens vollkommen verhindert. Strategien wie das Vermeiden hoher Schlammalter, niedrigen Sauerstoffstoffkonzentrationen und großer Mengen an Ammonium zeigten keine dauerhafte Lösung des Problems (Rossetti et al. 2005). Auch die Installation von Selektoren führte zu keinem ständigen Erfolg (Chudoba et al. 1973; Daigger und Nicholson 1990). Daher wird oft als schnelle und einfache Strategie zur Vermeidung übermäßigen Wachstums von *Microthrix parvicella* die Dosierung von Flockungsmitteln und Fällungsmitteln angewandt. Diese beinhalten jedoch neben Metallsalzen (beispielsweise Aluminium- oder Eisenverbindungen) auch Verunreinigungen mit Schwermetallen wie Blei, Kupfer und Zink.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellwand von *M. parvicella* einen hydrophoben Charakter aufweist (Nielsen et al. 2002). Um das Passieren von in Wasser gelösten Substraten wie beispielsweise der oben erwähnten Metallsalze durch diese hydrophobe Schicht zu gewährleisten, wäre es möglich, dass wassergefüllte Kanäle (Porine) in der Membran von *M. parvicella* eingebettet sind.

Ziel dieser Arbeit war es nun, eventuell vorhandene porenformende Proteine aus der Zellwand von *Microthrix parvicella* zu isolieren, aufzureinigen und durch den Einbau in künstliche Lipidmembranen biophysikalisch in Form von Einzelkanalmessungen, Selektivitätsbestimmungen und Bindungsexperimente zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser Messungen sollte eine Bindung von Inhaltsstoffen aus den handelsüblichen Fällungs- und Flockungsmitteln innerhalb des Kanals nachgewiesen werden. Weiterhin sollte gezeigt werden, welche Inhaltsstoffe aus den Lösungen letztendlich die wirksamen Komponenten zur Bekämpfung von *Microthrix parvicella* darstellen. Da es sich bei den Bekämpfungsmitteln um verunreinigte Nebenprodukte aus der Metallherstellung handelt, sollte die Arbeit Hinweise geben, durch welche Ersatzsubstanzen ebenso gute Resultate in Bezug auf das Vermeiden von Schwimm- und Blähschlamm erzielt werden können bei gleichzeitig geringerer Belastung für die Umwelt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Untersuchung des Einflusses metallhaltiger Substanzen auf den Organismus *Microthrix parvicella* wurden in dieser Arbeit zwei Reinkulturen des grampositiven Aktinomycets verwendet. Die Stämme, die freundlicherweise vom Bayerischen Landesamt für Umwelt in München (LFU) durch Frau Prof. Dr. Hilde Lemmer und Frau Dr. Margit Schade zur Verfügung gestellt wurden, wurden zunächst aus verschiedenen bayerischen Kläranlagen isoliert. Die beiden Reinkulturen mit den Namen Sta4 und Mber6 lagen für die Untersuchung in Flüssigkultur und auf Agarplatten vor (Schade und Lemmer 2006).

3.2 Anzucht der Reinkulturen

Zur Anzucht der Reinkulturen von *Microthrix parvicella* wurde ein modifiziertes flüssiges Luria/Miller-Medium (LB-Medium) verwendet. Das konventionelle LB-Medium enthielt zunächst standardmäßig:

10,0 g/l Trypton

5,0 g/l Hefeextrakt

10,0 g/l Natriumchlorid

Aqua bidest.

Da *Microthrix parvicella* zu den sogenannten Niedriglastbakterien gehört und niedrige Substratkonzentrationen bevorzugt, wurde das Medium 1:5 verdünnt. Um ein optimales Wachstum des Organismus zu gewährleisten, wurde das LB-Medium zusätzlich mit 0,04 % Tween 40 als Quelle für langkettige Fettsäuren angereichert. Wie bereits beschrieben, verwendet *Microthrix parvicella* hauptsächlich langkettige Fettsäuren beziehungsweise deren Derivate als Kohlenstoffquelle. Tween 40 zählt dabei zu den Derivaten der Palmitinsäure. Voruntersuchungen zur optimalen Kohlenstoffquelle von *Microthrix parvicella*-Reinkulturen wurden am LFU in München durchgeführt, wobei well-plates, die mit unterschiedlichen

kohlenstoffhaltigen Medien bestückt waren, mit *M. parvicella* angeimpft wurden. Beste Wachstumsergebnisse konnten dabei mit Tween 40 angereicherten Medien erzielt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass Tween 40 aufgrund seiner Funktion als Detergenz nur in geringen Konzentrationen verwendet werden darf, da es sonst nicht wachstumsfördernd sondern wachstumshemmend wirkt.

Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 wurde das LB-Medium vorschriftsmäßig autoklaviert und mit der Reinkultur angeimpft. Das Wachstum der Flüssigreinkulturen erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Anzucht auf Agar-Platten wurde ein modifizierter R2A-Agar verwendet. Der R2A-Agar enthielt zunächst standardmäßig:

0,5 g/l Hefeextrakt

0,5 g/l Proteose-Pepton

0,5 g/l Casein-Hydrolysat

0,5 g/l Glukose

0,5 g/l lösliche Stärke

0,3 g/l Natrium-Pyruvat

0,3 g/l K_2PO_4

0,05 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

12,0 g/l Agar-Agar

Aqua bidest.

Zur Einstellung niedriger Substratkonzentrationen wurde das Medium 1:2 verdünnt. Lediglich der Agaranteil wurde beibehalten. Um wie bei der Flüssigkultur die ausreichende Versorgung des Organismus mit Kohlenstoffen zu gewährleisten, wurden zum R2A-Agar zusätzlich 0,02 % Tween 40 hinzugefügt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 wurde der modifizierte R2A-Agar vorschriftsmäßig autoklaviert und ausplattiert. Anschließend wurden die Agarplatten mit Hilfe eines Drigalskispatels mit der *Microthrix parvicella*-Reinkultur angeimpft. Das Wachstum der Reinkulturen auf Agarplatten erfolgte wie bei den Flüssigkulturen bei Raumtemperatur.

Die notwendige Wachstumsdauer für eine ausreichende Reinkultur lag bei etwa 3 Wochen für Flüssigkulturen und etwa 4 Wochen für Kulturen auf Agarplatten. Die Wuchsform der Reinkultur insbesondere in der Flüssigkultur war dabei sehr markant. Einzelne Fäden gruppierten sich zu einer knäuelartigen Ansammlung, die durch leichtes Schütteln

auseinander gerissen werden konnte. Daher musste bei der Anzucht von *Microthrix parvicella* in Flüssigkultur auf einen möglichst schonenden Umgang mit den Kulturen geachtet werden. Starke Scherkräfte durch übermäßiges Schütteln sollten vermieden werden, da dies ein Brechen und somit Absterben der fädigen Filamente zur Folge haben könnte. Auch sollten normale Glaskolben und -flaschen einer Verwendung von Schikanekolben aufgrund der mechanischen Beanspruchung vorgezogen werden.

3.3 Isolation der Zellwand

Das Ernten der Bakterien aus Flüssigkultur und von Agarplatten unterschied sich nur minimal. Die flüssigen Kulturen wurden zunächst für 10 Minuten bei 6.000 x g und einer Temperatur von 20 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit den Bakterien wurde anschließend in 20 ml einer 50 mM Tris HCl-Lösung (pH 7,7) gelöst. Die Tris-Pufferlösung wurde zusätzlich mit 100 µl Protease Inhibitor angereichert, um einen späteren Proteinabbau während des Isolationsprozesses zu vermeiden. Die auf den Agarplatten gewachsenen Kulturen wurden mit Hilfe einer Impföse direkt in den oben beschriebenen Tris-Puffer überführt.

Um die Cytoplasmamembran und die Zellwand aus den Organismen zu isolieren, wurden die Zellen in der Lösung mit Hilfe einer French Press-Apparatur (SLM Instruments) aufgebrochen. Der Pressvorgang wurde mehrmals bei 900 PSI durchgeführt. Eine hohe Anzahl an Pressvorgängen war notwendig, da aufgrund der fädigen Struktur zunächst keine homogene Lösung vorlag. Die gewünschte Homogenität stellte sich erst nach mehreren Pressvorgängen ein. Zusätzlich zur French Press wurde bei Bedarf ein Aufknacken der Zellen mittels Ultraschall durchgeführt.

Zur Abtrennung der nicht aufgebrochenen Zellen wurde die Lösung mit den verschiedenen Zellfragmenten nach dem Pressvorgang für 10 Minuten bei 6.000 x g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Die nicht aufgebrochenen Zellen befanden sich aufgrund ihres höheren Gewichts im Pellet, die Cytoplasmamembran und die Zellwand in der Lösung. Daher wurde das Pellet verworfen und die restliche Lösung anschließend zur Isolation der Zellhülle für 1 Stunde bei 88.000 x g und einer Temperatur von 4 °C mit Hilfe einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckmann Omega 90 XL mit einem 90 Ti Rotor). Das dadurch erhaltene Pellet beinhaltete die gesuchte Zellhülle.

Um die Cytoplasmamembran und die Zellwand voneinander zu trennen, wurde ein Sucrosegradient durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet aus dem Ultrazentrifugationsschritt in 1 ml einer 10 mM Tris HCl-Pufferlösung (pH 8) gelöst und auf einen Sucrosegradienten geschichtet. Der Sucrosegradient bestand aus 3 Schichten unterschiedlich konzentrierter Sucroselösungen, die allesamt mit 10 mM Tris HCl (pH 8) gepuffert wurden. Die unterste Schicht des Sucrosegradienten bestand aus 3 ml einer 70 % Sucroselösung (g/v), die mittlere Schicht aus 4 ml einer 50 % Sucroselösung (g/v), die oberste Schicht aus 3 ml einer 30 % Sucroselösung (g/v). Der komplette Sucrosegradient samt gelöstem Pellet wurde für 16 Stunden bei 67.000 x g und einer Temperatur von 4 °C mit Hilfe eines Swing-Out-Rotors in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckmann Optima 90 XL Ultrazentrifuge mit einem SW40 Ti Rotor). Dabei musste beachtet werden, dass die Zentrifuge ohne Bremse betrieben wurde, da sonst das charakteristische Wandern der Proteine durch die Sucroreschichten gestört wurde. Der komplette Gradient wurde nach der Zentrifugation in mehrere Fraktionen aufgeteilt. Zum Nachweis der korrekten Abtrennung der Cytoplasmamembran und der Zellwand wurde ein NADH-Oxidase-Aktivitätstest durchgeführt und alle Fraktionen auf porenformende Eigenschaften mit Hilfe des Black Lipid Bilayers untersucht. Die NADH-Oxidase-Aktivität wurde über die Abnahme des Absorptionsgrades bei 340 nm gemessen (Mizuno und Kageyama 1978). Die Cytoplasmamembran und die Zellwand konnten dadurch unterschiedlichen Fraktionen zugeordnet werden. Zur Bestimmung des Proteingehalts der gesammelten Fraktionen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (siehe auch Abschnitt 3.7).

3.4 Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine

Die Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine wurde aus der Fraktion des Sucrosegradienten vorgenommen, welche die Zellwand beinhaltet. Diese Fraktion wurde zunächst für 1 Stunde bei 88.000 x g und einer Temperatur von 4 °C mit Hilfe einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 1 ml einer 1 % (v/v) Lauryldimethylaminoxid-Lösung (LDAO), die mit 10 mM Tris HCl auf einen pH-Wert von 8 gepuffert wurde, gelöst. Nach einstündigem Waschen auf einem Schüttler wurde die Lösung erneut für 1 Stunde bei 88.000 x g und einer Temperatur von 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die durch das Detergenz LDAO herausgelösten Membranproteine befanden sich nach der Zentrifugation isoliert im Überstand der Lösung. Abschließend wurden die isolierten

Membranproteine vor weiteren Aufreinigungsschritten auf porenformende Aktivität überprüft und der Proteingehalt mittels SDS-Page bestimmt.

Zur weiteren Aufreinigung der Proteine wurde der Überstand auf eine MonoQ 5/50 GL-Säule (GE Healthcare, 1 ml Säulenvolumen) aufgetragen und durch eine Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, Bio-Rad) bindungsabhängig in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt. Bei einer MonoQ-Säule handelte es sich um eine starke Anionenaustauschersäule, wodurch die Bindung des Proteins an die Säule von der jeweiligen Ladung des Proteins abhing.

Zur Durchführung des FPLC-Laufes wurde die Säule zunächst mit einer 1 % (v/v) LDAO-Lösung, gepuffert mit 10 mM Tris HCl auf einen pH-Wert von 8, gewaschen. Nach Auftragen der Proteinprobe wurden die an der Säule gebundenen Proteine durch Anlegen eines linearen Salzgradienten von 0 bis 1 M Natriumchlorid eluiert. Dazu wurde der beschriebene Waschpuffer mit immer größer werdenden Volumenanteilen des Elutionspuffers, der neben 1 % (v/v) LDAO und 10 mM Tris HCl (pH 8) zusätzlich 1 M Natriumchlorid enthielt, vermischt. Die genaue Durchführung der Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) wird im Abschnitt 3.5 näher beschrieben.

Die Fraktionen aus der FPLC, die bei der Aufzeichnung Proteinpeaks aufwiesen, wurden alle mit Hilfe von Rekonstitutionsexperimenten in künstlichen Lipidmembranen (Black Lipid Bilayer) auf porenformende Eigenschaften untersucht. Zusätzlich wurde der Proteingehalt nach Fällung der Proteine (gemäß Wessel und Flügge) mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abschnitt 3.7).

Zur weitergehenden Aufreinigung wurde die Fraktion des MonoQ-FPLC-Laufs, welche in Rekonstitutionsexperimenten die gewünschten porenformenden Eigenschaften zeigte, mit Hilfe einer zweiten FPLC aufgetrennt. Vor dieser zweiten FPLC wurden Fraktionen verschiedenster Läufe des ersten FPLC-Schritts, welche alle das gewünschte Protein enthielten, vereinigt und mittels Microcon[®]-Filtern der Firma Millipore aufkonzentriert. Dazu wurden jeweils 0,5 ml Proteinlösung in das Probenreservoir YM-10 pipettiert, ohne dabei die Membran zu beschädigen. Das Probenreservoir YM-10 besaß aufgrund seiner integrierten Membran eine Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa. Nach Verschließen des Filtergefäßes wurde die Probe für 30 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Im Gefäß befand sich nach der Zentrifugation eine Proteinlösung mit Proteinen kleiner 10 kDa, alle größeren Proteine wurden durch die Membran zurückgehalten und befanden sich daher im Probenreservoir YM-10. Um die Proteinlösung aus dem Probenreservoir YM-10 herauszulösen, wurde dieses anschließend mit entgegengesetzter Ausrichtung in ein neues Filtergefäß eingesetzt und für 3

Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert. Die aufkonzentrierte Proteinlösung befand sich nun im Filtergefäß.

Im Gegensatz zur ersten Chromatographie wurde für die weitere Aufreinigung mittels FPLC eine Superdex 75 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. Bei einer Superdexsäule handelte es sich nicht wie bei einer MonoQ-Säule um eine Ionenaustauschersäule, sondern vielmehr um eine Gelfiltrationssäule. Diese Gelfiltrationssäule trennte die Proteine unabhängig von der Ladung nach deren Größe auf. Die verschiedenen schweren Proteine wanderten dabei mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde die Superdex-Säule mit einem Puffer, welcher 150 mM Natriumchlorid (NaCl) und 10 mM Tris HCl (pH 8,0) enthielt, mit einer Flussrate von 0,5 ml pro Minute gewaschen. Mit Hilfe dieses Puffers wurden die gelösten Proteine durch die Gelfiltrationssäule transportiert. Wie bei der vorhergehenden FPLC konnten verschiedene Proteinfraktionen gesammelt werden, die auf porenformende Eigenschaften untersucht wurden. Auch wurde erneut der Proteingehalt nach Fällung der Proteine (Wessel und Flügel Fällung) mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abschnitt 3.7).

3.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde zur Aufreinigung der Membranproteine aus *Microthrix parvicella* eine Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) verwendet. Zur ersten Auftrennung der Proteine wurde dabei eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine MonoQ 5/50 GL-Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 1 ml an die Apparatur angeschlossen. Die MonoQ-Säule war mit einer unlöslichen Trägermatrix gefüllt, die Anionen adsorbierte und reversibel band. Die Trägermatrix bestand dabei aus organischen Polymeren, die an der Oberfläche kovalent gebundene, positiv-geladene Gruppen trugen.

Nach Auftragen der Probe auf die Säule wurden Proteine mit negativen Seitengruppen entsprechend ihrer Ladungsstärke an die Trägermatrix der Säule gebunden. Durch Anlegen eines linear ansteigenden Salzgradienten wurden die negativen Seitengruppen der Proteine anschließend durch die Anionen des Salzgradienten zu verschiedenen Zeitpunkten kompetitiv verdrängt und von der Säule eluiert. Diese zeitlich versetzte, kompetitive Verdrängung fand aufgrund unterschiedlicher starker Bindung zwischen den jeweiligen Probenkomponenten und

der Trägermatrix statt und verursachte dementsprechend eine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Bindungsstärke. Die einzelnen Fraktionen wurden letztlich mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen.

Zur weiteren Auftrennung der Proteine im Anschluss an die Anionenaustauscherchromatographie wurde mit Hilfe einer zweiten FPLC eine Gelfiltration durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4). Dazu wurde eine Superdex 75 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. Die Säule war dabei mit einer Matrix aus kreuzverlinkter Agarose und Dextran bepackt. Die Auftrennung der aufgetragenen Proteine erfolgte somit nicht durch Bindung an eine Trägermatrix, sondern durch ein unterschiedlich schnelles Durchqueren der Agarose-Dextran-Matrix gemäß der Proteingröße.

Die Absorptionsfähigkeit der eluierten Substanzen in den einzelnen Fraktionen wurde durch einen an die FPLC-Apparatur angeschlossenen UV-Detektor bei 280 nm gemessen und mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet. Aufgezeichnete UV-Peaks wiesen dabei auf Fraktionen mit eluierten Proteinen hin, da Proteine mit aromatischen Aminosäuren bei 280 nm Absorptionseigenschaften zeigten. Durch chromatographische Analysen (SDS-PAGE) oder Rekonstitutionsmessungen im Bilayer konnte letztendlich das gewünschte Protein einer Fraktion mit einem entsprechenden UV-Signal zugeordnet werden.

Zur Durchführung der vorher beschriebenen FPLC-Läufe wurde die komplette FPLC-Apparatur zunächst mit entgastem und sterilfiltriertem Nidrigsalz-Puffer (MonoQ-Säule) oder Waschpuffer (Superdexsäule) gespült. Für die Auftrennung mussten die Säulen zunächst mit dem Laufpuffer equilibriert werden. Die Probe wurde anschließend mit einer Einwegspritze luftblasenfrei auf den Probenschlauch aufgetragen, von dem aus die Säule mit der Probe beschickt wurde.

Der jeweilige Elutionsverlauf (z.B. durch Anlegen eines Salzgradienten) wurde durch einen Computer festgehalten. Ein Fraktionssammler sammelte die einzelnen Fraktionen. Um die Reproduzierbarkeit einzelner FPLC-Läufe zu gewährleisten, konnten die Einstellungen gespeichert und erneut genutzt werden.

3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Die Proteinfällung nach Wessel und Flügge (Wessel und Flügge 1984) diente der Aufkonzentrierung von Proteinlösungen. Gleichzeitig wurde die Probe von eventuellen Detergenz- und Lipidresten befreit, was eine Erhöhung der Probenreinheit zur Folge hatte.

Zur Durchführung der Proteinfällung nach Wessel und Flügge wurden zunächst 100 µl der jeweiligen Proteinlösung mit 400 µl Methanol durch Vortexen gut vermischt. Die Mischung wurde anschließend für 10 Sekunden bei 9.000 x g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Chloroform zur Lösung gegeben und nach Vortexen der Mischung erneut für 10 Sekunden bei 9.000 x g zentrifugiert. Nach einer weiteren Zugabe von 300 µl H₂O_{bidest} wurde die Mischung gevortext und bei 9.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die beschriebenen Schritte führten zu einer Denaturierung der Proteine, die sich nach dem 1-minütigen Zentrifugationsschritt in der Interphase befanden. Die obere Phase wurde daher vorsichtig mit einer langgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Dabei musste unbedingt darauf geachtet werden, dass die Interphase nicht zerstört wurde. Nach Abnahme des Überstandes bis zur Interphase wurden 300 µl Methanol hinzugegeben, gevortext und für 10 Minuten bei 9.000 x g zentrifugiert, wodurch ein Pellet aus den vorher denaturierten Proteinen entstand. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das verbleibende Proteinpellet wurde abschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.7 SDS-PAGE

Wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschrieben, wurde der Proteingehalt der verschiedenen Proben mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt (Abbildung 29). Das hier verwendete Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrem Molekulargewicht basierte auf Arbeiten von Laemmli (Laemmli 1970). Das im Probenpuffer und Polyacrylamidgel enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) band an die Proteine, sodass ein stark negativ geladener Komplex entstand. Da die Bindung proportional zum Molekulargewicht stattfand, konnten durch die Laufeigenschaften der Proteine im elektrischen Feld im Vergleich zu einem Referenzmarker Rückschlüsse auf das eigentliche Molekulargewicht des Proteins gezogen werden.

Bei der Elektrophorese wanderten die Natriumdodecylsulfat-Protein-Komplexe unterschiedlich schnell von der Kathode zur Anode, wobei kleinere, leichtere Proteine schneller die polyacrylamidvernetzten Schichten durchlaufen konnten als größere, schwerere Proteine. Zur besseren Auftrennung wurde ein diskontinuierliches System aus Sammel- und Trenngel verwendet. Dies hatte zur Folge, dass die Proben am Übergang vom Sammel- zum Trenngel konzentriert wurden, wodurch schärfere Banden entstanden. Auch wurde ein Aggregieren oder Ausfallen der Proteine verhindert.

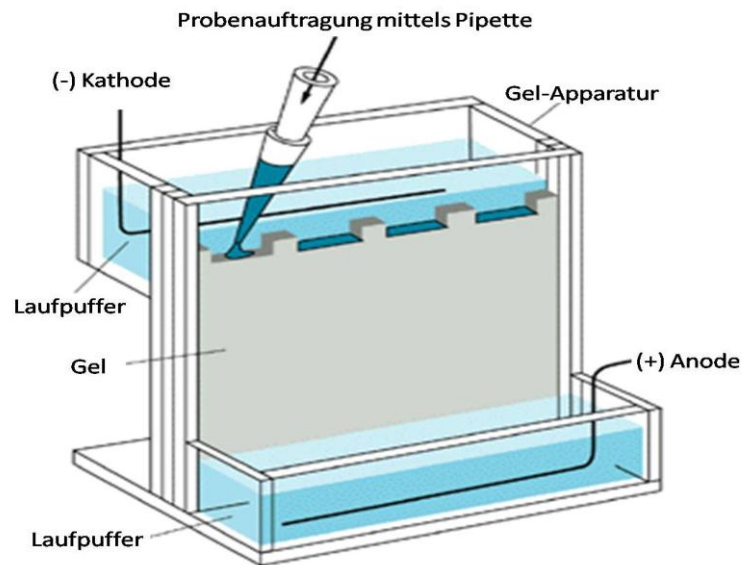


Abbildung 29: Aufbau einer typischen SDS-PAGE-Apparatur (Bild aus www.ibm-jena.de, 2011).

3.7.1 Herstellung der SDS Gele und Durchführen eines Elektrophoreselaufs

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden in der vorliegenden Arbeit standardmäßig 12 % SDS-Gele verwendet. Die Herstellung der SDS-Gele (Abbildung 29) wurde gemäß den Arbeiten von Laemmli (Laemmli 1970) mit Hilfe einer BIO-RAD-Gelapparatur durchgeführt. Dazu wurde zunächst zwischen zwei saubere Glasplatten, die im Abstand von 0,75 mm zueinander gelagert waren, das 12 % Trenngel gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Das Überschichten des Trenngels mit 1-Butanol führte zu einer geraden Gelfront. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das 1-Butanol vollständig entfernt (Spülen mit H_2O_{bidest}) und das 5 % Sammelgel anschließend direkt auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen. Zur Taschenbildung wurde abschließend ein Kamm eingesetzt. Nach erneutem Auspolymerisieren konnte der Kamm entfernt und das Gel für die Elektrophorese verwendet werden. Alternativ konnten die feuchten Gele mehrere Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Die genaue Zusammensetzung der SDS-Gele ist im Anhang in Abschnitt 10.4.1 detailliert aufgeführt.

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurde die Elektrophoresekammer zunächst mit Laufpuffer (s. Abschnitt 10.4.1) gefüllt und das polymerisierte Gel eingesetzt. Das bei der Wessel und Flügge-Fällung entstandene, getrocknete Proteinpellet wurde mit dem Probenpuffer (Redmix) versetzt, wobei der Probenpuffer unter anderem β -Mercaptoethanol zur Reduzierung der

Disulfidbrücken der Proteine enthielt (s. Abschnitt 10.4.1). Bei Bedarf wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung eventuell bestehender Komplexe und zur Entfaltung möglicher SDS-stabiler Tertiärstrukturen für 10 Minuten bei 100 °C gekocht. Zur Befüllung des Gels wurden die Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze oder einer Eppendorf-Pipette mit langgezogener Spitze in die auspolymerisierten Taschen des Sammelgels gefüllt. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem geeigneten Proteinmarker (s. Abschnitt 10.3) gefüllt, um das Molekulargewicht der Proteine und den Proteingehalt der Probe abschließend bestimmen zu können. Der Proteinmarker enthielt dabei eine definierte Menge an Standardproteinen, die nach Färbung bestimmten Molekulargewichten zugeordnet werden konnten (Weber und Osborn 1969).

Nach Befüllen des Gels mit den Proben und dem Proteinmarker wurde eine Spannung von 70 bis 80 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich bereits eine gerade Lauffront gebildet. Nach Passieren des Sammelgels wurde die Spannung auf bis zu 120 V erhöht. Ein Lauf eines 12 % Gels unter den beschriebenen Bedingungen dauerte in etwa 90 Minuten.

Zum Darstellung der aufgetrennten Proteine waren geeignete Färbemethoden notwendig (Coomassie-Färbung, colloidale Coomassie-Färbung, Silberfärbung). Diese wurden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

3.8 Färbemethoden

3.8.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde als vergleichsweise schonende Färbemethode von aufgetrennten Proteinen aus SDS-Gelen verwendet und komplett bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Polyacrylamidgel aus der Gelelektrophorese wurde dazu vorsichtig aus den Gläsern herausgelöst und in eine Färbelösung, die aus Methanol, Essigsäure und Coomassie-Brilliant-Blau R-250 bestand (s. Abschnitt 10.4.2), überführt. Nach einem etwa 30-minütigen Schütteln in der Färbelösung wurde das Gel in eine Entfärbelösung, bestehend aus Methanol und Essigsäure (s. Abschnitt 10.4.2), gegeben. Die Entfärbung erfolgte schließlich bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Klarheit des Hintergrundes, d.h. bis die Proteinbanden gut erkennbar waren. Zu einer besseren Entfärbung wurde die Entfärbelösung mehrmals

erneuert. Das Gel konnte nach Digitalisierung (Fotografieren, Scannen) in destilliertem Wasser gelagert oder zur Archivierung getrocknet werden.

3.8.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung diente wie die Coomassiefärbung der Darstellung von aufgetrennten Proteinen aus SDS-Gelen. Die Silberfärbung war zwar deutlich sensitiver als die Coomassiefärbung und ließ sogar Proteinkonzentrationen im Nanogrammbereich erscheinen, jedoch war sie nicht so schonend wie die Coomassiefärbung. Bei der Färbung lagerten sich Silberionen an die Proteine an und eine anschließende Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber führte zu einer bräunlich-schwarzen Färbung der Proteinbanden auf den SDS-Gelen.

Für die Silberfärbung, die komplett bei Raumtemperatur stattfand, wurde das SDS-Gel nach dem Elektrophoreselauf zunächst in eine Fixierlösung überführt (Lösung A, s. Abschnitt 10.4.2). Nach einer 10-minütigen Fixierungsphase in Lösung A wurde das Gel zweimal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend folgte ein Sensibilisierungsschritt, bei dem das Gel für eine Minute in Lösung B geschüttelt wurde. Das Natriumthiosulfat in Lösung B reduzierte eventuell oxidierte Cysteine, wodurch die Färbung noch sensibler wurde. Nach zwei kurzen Waschschritten (zweimal 20 Sekunden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) folgte der eigentliche Färbeschritt. Dazu wurde das Gel für 10 Minuten in einer silbernitratthaltigen Färbelösung (Lösung C) geschüttelt. Ein kurzer Waschschrift mit Lösung DW führte anschließend zum Ausfall von freiem Silbernitrat. Das gewaschene Gel wurde abschließend in die Entwicklerlösung (Lösung D) überführt. Die Silberatome bildeten dabei mit den Proteinen Komplexe, die als braun-schwarze Banden auf dem SDS-Gel sichtbar wurden. Ein Absenken des pH-Wertes durch Zugabe von 2,3 M Zitronensäure führte schließlich zur Komplexierung der restlichen Silberionen und einem Abstoppen des Färbeprozesses. Das gefärbte Gel konnte wie bei den anderen Färbemethoden nach Digitalisierung (Fotografieren, Scannen) in destilliertem Wasser gelagert oder zur Archivierung getrocknet werden.

3.8.3 Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau erlaubte die Färbung von Proteinen im Nanogramm-Bereich ohne die Verwendung von Silbernitrat. Sie war somit schonender als die Silberfärbung bei einer nur leicht schwächeren Färbeleistung und in etwa fünfmal sensitiver als die normale Coomassie-Färbung. Die anzufärbenden Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst für 1 Stunde in 12 % Trichloressigsäure (TCA) fixiert. Die fixierten Gele wurden anschließend für etwa 24 Stunden mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt (s. Abschnitt 10.4.2). Nach der Färbung wurde das Gel zwischen 7 Stunden und 2 Tagen mit destilliertem Wasser entfärbt, bis die blaugefärbten Banden deutlich sichtbar waren. Der Hintergrund war dabei so gut wie komplett entfärbt. Das gefärbte Gel konnte nach Digitalisierung (Fotografieren, Scannen) in destilliertem Wasser bis zu 3 Tagen gelagert oder zur Archivierung getrocknet werden.

3.9 Gelelution

Zum Herauslösen einzelner Proteinbanden aus einem SDS-Gel und zu deren weiterer Nutzung wurde eine Gelelution verwendet. Um porenformende Aktivität der Proteine auch nach einer Gelelektrophorese zu gewährleisten, musste die Gelelektrophorese zunächst sehr schonend durchgeführt werden. Sie unterschied sich dabei in wichtigen Punkten von der normalen Auftrennung im elektrischen Feld. Die erste Tasche wurde wie bei der normalen Elektrophorese mit dem Proteinmarker befüllt. Die Probe hingegen wurde auf mindestens zwei Taschen verteilt. Während bei der Tasche neben dem Proteinmarker die Probe mit dem normalen Elektrophoreselaufpuffer vermischt wurde, fand bei der folgenden Tasche ein farblosere Laufpuffer Verwendung (s. Abschnitt 10.4.1). Dieser farblose Laufpuffer enthielt weder Bromphenolblau noch β -Mercaptoethanol, da beide die Proteine denaturieren könnten. Für eine größere Ausbeute wurden mehrere Taschen mit der Probe und dem farblosen Puffer gefüllt.

Zur weiteren schonenden Behandlung und zur Vermeidung einer eventuellen Denaturierung der Proteine durften die Proben vor dem Elektrophoreselauf nicht gekocht werden und die angelegte Spannung durfte aufgrund der Wärmeentwicklung nicht zu hoch gewählt werden, weshalb auch die Elektrophorese im Kühlschrank durchgeführt wurde. Ob die Proben nach

Wessel und Flüge gefällt werden durften, hing von der jeweiligen SDS-Sensibilität der Proteine ab.

Zur Durchführung der Gelelution wurde ein elektrisches Feld mit niedriger Spannung angelegt. Nach Beenden der Gelektrophorese wurde die Glasscheibe über dem Gel vorsichtig gelöst und mit einem Skalpell die ersten beiden Gelspuren (Marker plus Probe mit blauem Laufpuffer) vom restlichen Gel sorgsam getrennt. Die Proteinbanden der abgeschnittenen Gelspuren konnten dann mit geeigneten Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Während der Färbung wurde das restliche Gel im Kühlschrank gelagert. Nach Erscheinen des Bandenmusters und Abstoppen der Färbung wurde das abgeschnittene Gelstück an die Schnittkante des restlichen Gels gelegt. Dabei konnte die Größe der beiden abgeschnittenen Gelspuren mittels Ethanol beziehungsweise Wasser an die Größe des restlichen Gels angepasst werden. Das ungefärbte Gel wurde nun anhand des Bandenmusters der abgeschnittenen Gelspuren horizontal geschnitten, sodass mehrere Gelabschnitte entstanden. Die geschnittenen Gelabschnitte wurden fraktioniert und in jeweils 1 ml einer 1 % (v/v) LDAO-Lösung zur Elution der Proteine aus dem Gel überführt. Zusätzlich wurden die Gelabschnitte in der Lösung mit Hilfe eines Pistills zerkleinert, um ein besseres Herauslösen der Proteine durch das Detergenz zu ermöglichen. Nach Schütteln der Lösung mit den Gelstücken über Nacht bei 4 °C konnte der Proteingehalt der jeweiligen Probe mittels SDS-PAGE ermittelt oder die Probe auf porenformende Eigenschaften im Bilayer untersucht werden.

3.10 Black Lipid Bilayer

Die Membranproteine von *Microthrix parvicella* wurden mit Hilfe von künstlichen Lipidmembranen, auch als „Black Lipid Bilayer assay“ bekannt, auf porenformende Eigenschaften untersucht. Dieses einfache und gut definierte System stellte eine gute Methode zur biophysikalischen Charakterisierung der Porine von *M. parvicella* dar (Benz et al. 1978; Benz et al. 1979).

3.10.1 Theorie des Black Lipid Bilayers

Für die Erzeugung der zur Messung notwendigen künstlichen, bimolekularen Schicht wurde ein Lipidfilm über ein Loch in der Trennwand zweier wässriger Kompartimente gespreitet. Der Film schillerte dabei zunächst in den Newtonschen Farben. Erst durch das Abfließen der Lösung entstand aus dem multimolekularen Lipidfilm eine biomolekulare, schwarz erscheinende Schicht, die mit ihrer Dicke von etwa 6 nm einer natürlichen, biologischen Membran ähnelte. Der optische Effekt des sogenannten „Schwarzwerdens“ der Membran beruhte auf der Reflektion des Lichts. Das von der Membran auf der Vorder- und Rückseite reflektierte Licht besaß einen Gangunterschied von $\lambda/2$. Dadurch löschten sich die Wellen gleich großer Amplituden gegenseitig aus, wodurch die bimolekulare Membran schwarz erschien.

Die Lipidmembran konnte im Versuch als kapazitiver Widerstand verstanden werden. Dabei betrug die flächenspezifische Leitfähigkeit einer reinen Lipidmembran in 1 M Natriumchloridlösung etwa 10 nS/cm². Kam es nun zu einem Einbau kanalartiger Moleküle in die Membran, erhöhte sich der Stromfluss und die Leitfähigkeit verändert sich. Die Leitfähigkeit über der Membran war dabei abhängig vom gewählten Elektrolyt (z.B. KCl, LiCl, KAc), von der jeweiligen Elektrolytkonzentration (z.B. 0,1 M, 1 M, 3 M) und den Eigenschaften des porenbildenden Proteins. Die durch den Einbau der kanalartigen Moleküle hervorgerufenen Änderungen der Leitfähigkeit konnten durch entsprechend empfindliche Messapparaturen sichtbar gemacht werden und der Einbau einzelner porenbildender Proteine detektiert und analysiert werden. Zur Minimierung des störenden, kapazitiven Rauschens musste die Membranfläche dabei so klein sein, dass ein ausreichender Signal-Rauschabstand erreicht werden konnte.

3.10.2 Aufbau der Messapparatur am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg

Das Kernstück der Messapparatur am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bildete eine Teflonküvette (Abbildung 30), welche zwei durch eine Trennwand unterteilte Kompartimente beinhaltete. In die Trennwand integriert war eine kreisförmige, auf der Vorderseite kegelförmig eingesenkte Öffnung, wobei der Bohrungsquerschnitt etwa 0,07 bis

0,5 mm² betrug. Mit Hilfe einer Teflonschleife wurde der Lipidfilm über diese Öffnung gespreitet, um eine künstliche Lipidmembran zu erzeugen. In die beiden mit Elektrolyt gefüllten Kompartimente tauchten Ag/AgCl-Elektroden ein, von denen eine an eine Spannungsquelle angeschlossen war. Die zweite Elektrode leitete den durch die Membran fließenden Strom ab und war daher je nach Art der Messung mit einem Elektrometer (Keithley 617) für Selektivitätsmessungen oder einem Verstärker (Keithley 427) für Einzelkanal- oder Spannungsabhängigkeitsmessungen verbunden. Das abgeleitete Stromsignal wurde in ein Spannungssignal mit einer Verstärkung von 10⁷ V/A bis zu 10¹¹ V/A umgewandelt und auf einen Streifenschreiber (Rikadenki) übertragen (Abbildung 30).

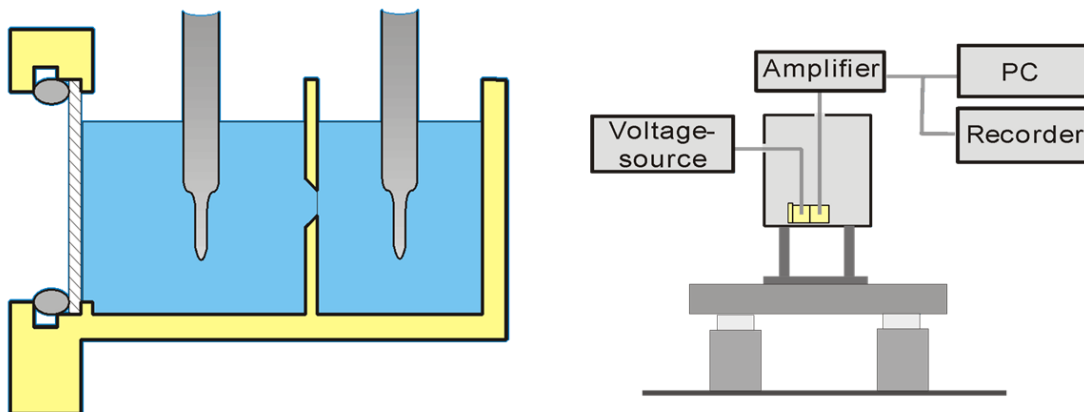


Abbildung 30: Schematische Darstellung der für den Nachweis der porenbildenden Eigenschaften der Proteine verwendeten Teflonkammer und Bilayerapparatur (Lehrstuhl für Biotechnologie, AG Benz, Universität Würzburg).

Die aus Teflon gefertigte Messküvette und die Ag/AgCl-Elektroden befanden sich in einem Metallgehäuse (Abbildung 31). Dieses Metallgehäuse hatte die Funktion eines Faraday'schen Käfigs, der den Innenraum vor äußeren elektrischen Feldern und elektromagnetischen Wellen abschirmte. In der Tür des Metallgehäuses war ein Loch integriert, durch das die Membran mit Hilfe eines optischen Fernrohrs beobachtet werden konnte (z.B. Schwarzwerden der Membran, angehaftete Luftblasen, etc.). Eine externe Lichtquelle ermöglichte es, über das Loch die Membran zu beleuchten. Um störende Lichtreflexionen am Glasfenster der Küvette bei der Beobachtung der Membran auszuschließen, war die Trennwand zwischen den Kompartimenten um 10° schräg gestellt. Ein unter dem Metallgehäuse befindlicher

Magnetrührer erlaubte die Durchmischung der Elektrolytlösung durch spezielle Magnetrührfische, die kreisförmig waren und auf der Oberfläche ein eingefasstes Kreuz besaßen. Das Kreuz ermöglichte zusammen mit einem kleinen Auflagepunkt auf der Unterseite des Rührfisches ein schonendes Durchmischen der Elektrolytlösung, ohne dass dabei die sensible Messung beeinträchtigt wurde. Zusätzlich war die komplette Messapparatur auf einer schwingungsgedämpften Granitplatte gelagert, um ein erschütterungsbedingtes Signalschwanken und ein mögliches Reißen der Membran zu verhindern.



Abbildung 31: Aufbau der Black Lipid Bilayer Apparatur am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg (Lehrstuhl für Biotechnologie, AG Benz, Universität Würzburg).

3.10.3 Vorbereitung einer Messung mit der Bilayer-Apparatur

Für die Analyse porenformender Proteine von *Microthrix parvicella* wurde für den Lipidfilm standardmäßig das Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin, kurz DiphPC, in einer Konzentration von 1 % verwendet (Abbildung 32).

Als Stocklösung wurde DiphPC 4 % in Chloroform gelagert. Zur Herstellung der 1 % DiphPC-Gebrauchslösung wurde das Chloroform aus 50 μ l der Stocklösung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Zum verbleibenden Lipidrest wurden 200 μ l n-Dekan und

20 μl Butanol zugegeben. Für die 2 % DiphPC-Imprägnierlösung wurde die Stocklösung mit Chloroform 1:1 vermischt.

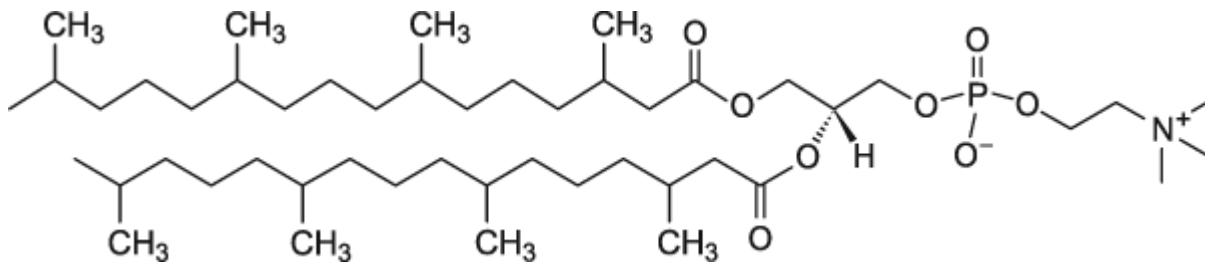


Abbildung 32: Das Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin (DiphPC) für die Erzeugung künstlicher Lipidmembranen (<http://avantilipids.com/images/structures/850356s.gif>, 2012)

Zur Vorbereitung der Messung wurde die Teflonküvette dreimal sorgfältig mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet. Das in die Trennwand eingelassene Loch wurde durch Auftragen von 5 μl 2 % DiphPC in Chloroform imprägniert. Da das Chloroform als Lösungsmittel verdampfte, bildete sich um das Loch ein schmaler Lipidring, der die spätere Benetzung mit der lipidhaltigen Gebrauchslösung erleichterte. Die zwei Kompartimente der Küvette wurden anschließend für die Messung mit jeweils 5 ml der entsprechenden Elektrolytlösung gefüllt.

Zur Herstellung der künstlichen Membran über dem Loch wurden 5 μl der 1 % DiphPC-Gebrauchslösung auf eine mit Kupferdraht stabilisierte Teflonschleufe gegeben. Nach Anlegen einer Spannung wurde der Lipidtropfen mit Hilfe der Teflonschleufe über die Öffnung der Trennwand vom hinteren Kompartiment her gespreitet. Nach Schwarzwerden der Membran konnte die zu untersuchende Probe *cis*-, *trans*- oder beidseitig in die Kompartimente gegeben werden. Für einen besseren Einbau der Kanalmoleküle war es von Vorteil, die Proteinlösung 1:1 oder 1:10 mit 1 % Genapol/ Cholesterol zu verdünnen. Die angelegte Spannung betrug im Normalfall 20 mV (Ausnahme: Messung der Spannungsabhängigkeit) und der Anfangsverstärkungsfaktor 10^9 V/A.

3.10.4 Digitalisierung von Messaufzeichnungen

Für die Darstellung der Schreiberaufzeichnungen der Bilayermessapparatur wurde das Original am Computer zunächst eingescannt und störende Streifen (z.B. durch die Musterung

des Schreiberpapiers) zur besseren Übersicht entfernt. Der wissenschaftliche Inhalt wurde dabei weder verändert noch in einem verfälschenden Zusammenhang dargestellt.

3.10.5 Einzelkanalmessungen

Eine reine Lipidmembran war für die Ionen der jeweiligen Elektrolytlösungen nahezu undurchlässig. Bei einer angelegten Spannung von 20 mV floss somit kein Strom. Der Stift des Streifenschreibers wurde daher zu Beginn der Einzelkanalmessung justiert und nach Stabilisierung des Systems zeigte der Schreiber eine Nulllinie. Durch Zugabe von porenbildenden Proteinen zur Elektrolytlösung kam es zu einem Einbau von ionenpermeablen Kanälen in die künstliche Lipidmembran, wodurch die Leitfähigkeit sprunghaft stieg. Dieser Anstieg war am Schreiber oder alternativ an einem angeschlossenen Oszilloskop als Rechteckamplitude erkennbar.

Die Messung der Einzelkanalleitfähigkeit wurde in verschiedenen Elektrolytlösungen (z.B. Kaliumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumacetat) und mit unterschiedlichen Molaritäten (z.B. 0,1 M, 1 M, 3 M) durchgeführt. Für eine ausreichend statisch abgesicherte Auswertung der Einzelkanalleitfähigkeit war eine hinreichend große Menge von Einzeleinbauereignissen notwendig. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit einer Pore wurden daher für jede Einzelmessung mindestens 100 Poren ausgewertet. Für die statistische Auswertung der Messung wurde ein Histogramm erstellt, bei dem die Häufigkeit der Leitfähigkeitsamplituden gegen die Leitfähigkeit aufgetragen wurde. Bei niedriger Streuung der Einzelwerte wurde der am häufigsten auftretende Leitfähigkeitswert als Einzelkanalleitfähigkeit definiert. Bei größerer Streuung wurde die Einzelkanalleitfähigkeit durch Bildung eines Mittelwertes ermittelt. Aus der Höhe der Schreiberausschläge und den entsprechend eingestellten Eingangsparametern (eingestellte Spannung bei Vollausschlag des Schreibers, angelegte Spannung und Verstärkungsfaktor) konnte die Leitfähigkeit der Pore berechnet werden.

Die der Berechnung der Leitfähigkeit zugrunde liegenden Formeln sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

Für die Leitfähigkeit G gilt:

$$G = \frac{I}{U_e} \quad (1)$$

mit G = Leitfähigkeit [S]
 I = Strom [A]
 U_e = angelegte Spannung [V]

Der das System durchfließende Strom I wird verstärkt und in eine Spannung umgewandelt, die am Schreiber beziehungsweise am Oszilloskop anliegt. Diese Ausgangsspannung U_a [V] ist dabei dem Strom I proportional. Der Proportionalitätsfaktor entspricht dem Verstärkungsfaktor V_f [V/A].

Für den Strom I gilt daher:

$$I = \frac{U_a}{V_f} \quad (2)$$

mit U_a = Ausgangsspannung [V]
 V_f = Verstärkungsfaktor [V/A]

Durch Einsetzen von (2) in (1) folgt:

$$G = \frac{U_a}{V_f \cdot U_e} \quad (3)$$

Aus praktischen Gründen wird die Ausgangsspannung U_a , welche am Schreiber beziehungsweise am Oszilloskop anliegt, auf das Raster des Schreiberpapiers bezogen. Das Schreiberpapier wird dabei in 100 gleichgroße Kästchen eingeteilt. Die Spannung pro Kästchen ergibt sich daher aus der am Schreiber eingestellten Spannung bei Vollausschlag U_V geteilt durch die Anzahl der Kästchen (100).

Durch Ersetzen von U_a durch U_V in (3) erhält man die Leitfähigkeit pro Kästchen G_K :

$$G_K = \frac{U_V}{V_f \cdot U_e \cdot 100} \quad (4)$$

mit G_K = Leitfähigkeit pro Kästchen [S]
 U_V = Schreibervollausschlag [V]

Durch Abzählen der Kästchenanzahl, die ein Schreiberausschlag umfasst, und Multiplikation der Kästchenanzahl mit G_K ergibt sich schließlich die Leitfähigkeit der Einzelereignisse.

3.10.6 Messung der Ionenselektivität

Die durch Proteine geformten Membrankanäle sind für Ionen unterschiedlich gut permeabel. Das Selektivitätsverhalten hängt dabei von der Ladung des Ions, der Größe der Hydrathülle des Ions und von der Ladungsverteilung im Inneren und an der Außenseite des Kanals ab. Zur Bestimmung der Selektivität der Kanäle wurde über der Membran ein Salzkonzentrationsgradient erzeugt (Benz et al. 1979; Ludwig et al. 1986). Im Falle einer vorhandenen Selektivität wanderte die Ionensorte, für die der Kanal selektiv war, bevorzugt zur weniger konzentrierten Seite der Membran, um den vorhandenen Konzentrationsgradienten auszugleichen. Dadurch entstand eine dem Konzentrationsgradienten entgegenwirkende Potenzialdifferenz und es stellte sich letztendlich ein Gleichgewicht im elektrochemischen Potenzial ein.

Die Bestimmung der Ionenselektivität wurde mit 0,3 M und 3 M Elektrolytlösungen durchgeführt. Dazu wurden beide Kompartimente einer vorbereiteten Teflonküvette mit 5 ml der 0,3 M Salzlösung gefüllt. Nach Zugabe der Proteine in beide Kompartimente kam es zu einem Kanaleinbau in die künstliche Lipidmembran. Der Einbau der Poren wurde durch den am Elektrometer sichtbaren, steigenden Stromfluss beobachtet. Nach Einbau von mindestens 100 Poren wurde das Elektrometer dann von Strom- auf Spannungsmessung umgestellt und die angelegte Spannung abgeschaltet. Zur Erzeugung des erforderlichen Konzentrationsgradienten wurden anschließend 100 µl einer 3 M Elektrolytlösung in das vordere Kompartiment und 100 µl einer 0,3 M Elektrolytlösung in das hintere Kompartiment gegeben. Die Zugabe der weniger konzentrierten 0,3 M Elektrolytlösung in das hintere Kompartiment diente dem Volumenausgleich, um einen hydrostatischen Druck auf die

Membran zu vermeiden. Nach einigen Minuten stellte sich ein Gleichgewicht im elektrochemischen Potenzial ein und die entstandene Spannung konnte am Elektrometer abgelesen werden. Nun konnte eine weitere Zugabe der unterschiedlichen Elektrolytlösungen durchgeführt werden, um einen immer größer werdenden Konzentrationsgradienten aufzubauen. Bei einem kationenselektiven Kanal wurde die abzulesende Spannung am Elektrometer nach jeder Zugabe stetig positiver, bei anionenselektiven Kanälen hingegen immer negativer.

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Benz et al. 1979) konnte bei einem gegebenen Konzentrationsgradienten und gleichzeitig gemessener Spannung das Permeabilitätsverhalten der Ionen P_k/P_a berechnet werden.

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ist im nachfolgenden Kasten näher beschrieben:

$$V_M = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_k c'' + P_a c'}{P_k c' + P_a c''} \quad \text{Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung}$$

mit	V_M	=	Membranpotenzial [V]
	R	=	allgemeine Gastkonstante
	T	=	absolute Temperatur [K]
	F	=	Faradaykonstante
	P_k	=	Permeabilitätskonstante des Kations
	P_a	=	Permeabilitätskonstante des Anions
	c'	=	Konzentration im cis-Kompartiment (vorne)
	c''	=	Konzentration im trans-Kompartiment (hinten)

wobei stets $c'' > c'$ gilt.

3.10.7 Messung der Spannungsabhängigkeit

Der Öffnungszustand von spannungsabhängigen Kanälen hängt von dem über dem Kanal anliegenden Spannungswert ab. Überschreitet die Spannung einen bestimmten Wert, kommt es bei einigen Porinen zu einem Schließvorgang. Diese Schaltvorgänge erfolgen nicht nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip, sondern vielmehr über mehrere Zwischenstufen. Hervorgerufen werden diese Schaltvorgänge durch Konformationsänderungen der Proteine,

bei denen geladenen Gruppen in Wechselwirkung mit dem anliegenden elektrischen Feld treten.

Der Versuchsaufbau zur Messung der Spannungsabhängigkeit war identisch mit dem Aufbau der Einzelkanalmessung, wobei die Zugabe der Proteinlösung nur einseitig erfolgte. Die Messung der Spannungsabhängigkeit begann, wenn sich nach Einbau mehrerer Poren nach einiger Zeit nur noch vereinzelt Poren in die Membran einbauten und sich zwischen Ein- und Ausbau der Poren nahezu ein Gleichgewicht ausgebildet hatte. Nach dem Ausschalten der angelegten Spannung wurde der Schreiberstift zur Protokollierung in der Papiermitte justiert. Dann wurden alternierend positive und negative Spannungen in steigenden 10 mV-Schritten angelegt (+10 mV, - 10mV, + 20 mV, - 20 mV, usw.). Die jeweilige Höhe des Schreiberausschlags nach Anlegen der Spannung entsprach dabei der Summe der Einzelkanalleitfähigkeiten der eingebauten, offenen Kanäle. Dieser Anfangswert beschrieb die Ausgangsleitfähigkeit G_0 . Bei einer vorhandenen Spannungsabhängigkeit schlossen sich einzelne Kanäle, die Leitfähigkeit der Membran nahm ab und als Folge dessen verringerte sich der Schreiberausschlag. Bei nicht spannungsabhängigen Poren ließ sich solch ein Effekt nicht beobachten.

Die jeweilige positive oder negative Spannung wurde solange angelegt, bis sich die Leitfähigkeit auf einen konstanten Wert eingependelt hatte, d.h. bis die Leitfähigkeit nicht mehr sank. Dieser Endwert entsprach der gemessenen Leitfähigkeit G .

Zur Auswertung der Spannungsabhängigkeit wurde das Verhältnis der gemessenen Leitfähigkeit G zur Ausgangsleitfähigkeit G_0 bei einer angelegten Spannung V_m aufgetragen (siehe nachstehender Kasten). Bei einer Spannungsabhängigkeit ergab sich dadurch eine Glockenkurve. Diese konnte zusätzlich Asymmetrien enthalten, wenn die Kanäle auf positive beziehungsweise negative Spannungen unterschiedlich stark reagierten.

$$V_M = \frac{G}{G_0}$$

3.10.8 Bindungsmessung mit Hilfe der Titrationsmethode

Die mögliche Bindung von Metallsalzen in Porinen von *Microthrix parvicella* wurde in Bindungsmessungen mit Hilfe der Titrationsmethode untersucht. Diese Titrationsmethode

wurde bereits bei Bindungsmessungen von Malto-Oligosacchariden an kohlenhydratspezifischen Porinen verwendet (Benz et al. 1986; Benz et al. 1987).

Da der Stofftransport durch eine Pore nicht direkt gemessen werden konnte, wurde die Titrationsmethode als indirekte Messung verwendet. Im Falle einer Bindung eines Moleküls in der Pore wurde der Durchlass nachfolgender Ionen vollständig oder zumindest teilweise blockiert. Eine Substratbindung an eine Bindestelle im Kanal konnte somit durch einen eingeschränkten Ionenfluss und folglich einer Abnahme der Leitfähigkeit detektiert beziehungsweise sichtbar gemacht werden.

Die Messung von Substratbindungen erfolgte in Mehrkanalexperimenten unter stationären Konditionen. Dazu wurde das porenformende Protein zu einer schwarzen Diphytanoyl-Phosphatidylcholin/ *n*-Dekan-Membran hinzugegeben. Durch den Einbau von Kanälen in die Membran stieg die gemessene Leitfähigkeit an, bis sich eine stationäre Leitfähigkeit, sichtbar als sigmoider Kurvenverlauf, einstellte. Zu diesem Zeitpunkt war ein Gleichgewicht von Kanaleinbauten und Kanalausbauten zu verzeichnen. Nach Einstellen dieser stationären Leitfähigkeit konnte die eigentliche Titrationsmessung beginnen. Dazu wurde die zu untersuchende Lösung in definierten Konzentrationen auf beiden Seite der Membran hinzugefügt. Kontinuierliches Rühren mit speziellen Rührfischen erlaubte dabei ein vollständiges Vermischen des zu untersuchenden Stoffes im vorliegenden Elektrolyt. Da die Stammlösungen (metallhaltige Salzlösungen) allesamt einen stark sauren pH-Wert ($\text{pH} \leq 1$) aufwiesen, wurden die Lösungen zunächst durch Zugabe von Natronlauge auf einen pH-Wert von 4,5 bis 5,5 angehoben. Dies sollte ein Reißen der Membran aufgrund des niedrigen pH-Wertes verhindern. Durch Anheben des pH-Wertes kam es zu einem Ausfällen der Metallsalze in der Lösung. Um diesen Ausfall-Effekt zu minimieren, wurden die Lösungen vor Anheben des pH-Wertes zunächst 1 zu 10 beziehungsweise 1 zu 100 verdünnt.

Gebundene Moleküle im Kanal führten bei der Messung zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Membranleitfähigkeit, welche durch einen reduzierten Ionenfluss hervorgerufen wurde. Stellte sich nach der jeweiligen Zugabe erneut eine stationäre Leitfähigkeit der Membran ein, konnte die Konzentration des zugegebenen Stoffes weiter erhöht werden. Durch diese stufenweise Erhöhung der Stoffkonzentration in der Elektrolytlösung kam es bei Bindung der Stoffe im Kanal zu einer ebenfalls stufenweisen Abnahme der Membranleitfähigkeit. Die Titration wurde beendet, wenn die Membranleitfähigkeit konstant war und weitere Zugaben keine Abnahme der Leitfähigkeit mehr zur Folge hatten.

Aus den Leitfähigkeitsdaten der Titrationsmessung konnte in Abhängigkeit von der Stoffkonzentration der prozentuale Anteil besetzter Poren bestimmt werden. Mit Hilfe der

nachfolgend dargestellten Michaelis-Menten-Kinetik konnte die Bindekonstante K aus den Messdaten errechnet werden. Dazu wurde die zunehmende Stoffsättigung G_c mit steigenden Stoffkonzentrationen ($1 + K \cdot c$) in Beziehung gesetzt (Benz et al. 1987).

Bei der Michaelis-Menten-Kinetik gilt:

$$G_c = \frac{G_{max}}{1 + K \cdot c} \quad \text{Michaelis-Menten-Kinetik}$$

mit	G_c	=	Leitfähigkeit nach Stoffzugabe [S]
	G_{max}	=	maximale Leitfähigkeit vor Stoffzugabe [S]
	K	=	Stabilitätskonstante [l/mol]
	c	=	Stoffkonzentration [mol/l]

Obige Gleichung der Michaelis-Menten-Kinetik kann auch geschrieben werden als:

$$\frac{G_{max} - G_c}{G_{max}} = \frac{K \cdot c}{K \cdot c + 1}$$

Die Leitfähigkeit kann somit schließlich als Funktion der Salzkonzentration durch einen Lineweaver-Burk-Plot analysiert werden.

Obige Gleichung ließ jedoch nicht immer eine ausreichende Genauigkeit zu. Dies war damit zu begründen, dass entweder die Kanäle nicht komplett geschlossen waren, wenn die Bindestelle durch die verschiedenen Stoffe besetzt war oder dadurch, dass nur ein Teil der Kanäle komplett geschlossen war.

Nachfolgende Gleichung erlaubte daher eine bessere Genauigkeit, da sie dieses Problem berücksichtigte (Andersen et al. 2003):

$$\frac{G_{max} - G_c}{G_{max}} = \left(1 - \frac{G_{\infty}}{G_{max}}\right) \frac{K \cdot c}{K \cdot c + 1}$$

wobei G_{∞} die Leitfähigkeit bei sehr hohen Substratkonzentrationen war, wie beispielsweise die Leitfähigkeitsfraktion, die nicht auf die verschiedenen Stoffe reagierte.

4 ERGEBNISSE

4.1 Anzucht der Reinkulturen von *Microthrix parvicella*

Die Anzucht der Reinkulturen von *Microthrix parvicella* war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht ausreichend für die Verwendung in Bilayer-Experimenten beschrieben und musste daher etabliert werden. Mit Hilfe einer Flüssigkultur (1:5 verdünntes LB-Medium, angereichert mit 0,04 % Tween 40) und auch mit Agarplatten (1:2 verdünnter R2A-Agar, angereichert mit 0,02 % Tween 40) konnte eine ausreichende Kultur des filamentösen Organismus angezogen werden. Die Wachstumsrate ist dabei jedoch deutlich langsamer als in einem Belebtschlammbecken einer Kläranlage, in dem sich zusätzlich Bakterienflocken an die Fäden von *Microthrix parvicella* anlagern und Symbiosen entwickeln können. Für eine ausreichende Kultur war eine Wachstumszeit von 3 Wochen für die Flüssigkultur beziehungsweise 4 Wochen für das Wachstum auf Agarplatten notwendig. Flüssigkulturen führten zwar zu höheren Wachstumsraten, Agarplatten waren aber insgesamt von Vorteil, da die Reinheit der Kolonien besser kontrolliert werden konnte.

Die Morphologie von *M. parvicella* ist einzigartig. Während der Wachstumszeit gruppieren sich einzelne Fäden zu einer knäuelartigen Ansammlung, die in der Kultur schwebt beziehungsweise auf der Agaroberfläche fädige Knäuelstrukturen bildet. Ein Schütteln der Kulturen führte zu einem Auseinanderreißen der Fadenansammlung, die sich aber anschließend wieder schnell zusammengruppierte. Ein zu starkes Schütteln und eine dadurch verursachte, zu starke mechanische Belastung führten zu einem Brechen der Filamente von *M. parvicella*. Als Folge dieser mechanischen Belastung waren verstärkt Filamentbruchstücke in der Lösung sichtbar und die Wachstumsrate ging stark zurück.

Die beste Wachstumsrate von *Microthrix parvicella* Reinkulturen konnte mit einem sogenannten Belebtschlammhydrolysat (Eikelboom 1975) erreicht werden. Das Belebtschlammhydrolysat wurde aus Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage in Würzburg hergestellt und zeigte stets gute Wachstumsergebnisse. Wie spätere Kontrollversuche in Form von Einzelkanalmessungen im Black Lipid Bilayer jedoch zeigten, war das Belebtschlammhydrolysat für Untersuchungen porenformender Eigenschaften der Membranproteine von *Microthrix parvicella* aufgrund seiner eigenen porenformenden Aktivität ungeeignet. Eine Zugabe des reinen Mediums zu schwarzen Lipidmembranen, d.h. ohne vorherige Animpfung mit den Bakterienkulturen, führte bei Einzelkanalmessungen zu

einem Einbau verschieden großer Kanäle in die Membran. Trotz mehrmaligem Autoklavieren war stets ein Kanaleinbau zu beobachten, wodurch zwischen „Belebtschlamporen“ und Poren von *M. parvicella* nicht unterschieden werden konnte. Das Medium konnte daher für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit nicht verwendet werden.

Versuche mit anderen Medien oder anderen Konzentrationen an Fettsäuren zeigten deutlich schlechtere Wachstumsraten als mit geringen Mengen Tween 40 angereicherte LB-Medien und R2A-Agarplatten. Flüssigmedien ohne Zugabe langkettiger Fettsäuren wie beispielsweise ein reines LB-Medium zeigten nur anfänglich ein minimales Wachstum. Mit Tween 60, Tween 80 oder Asolectin (Phospholipidmischung aus Sojabohnen) angereicherte Flüssigmedien führten zwar zu einem Wachstum von *Microthrix parvicella*, welches aber geringer ausfiel als das Wachstum in mit Tween 40 angereicherten Medien.

Eine Beimischung höherer Konzentrationen von Tween 40 zum Medium, z.B. Zugabe von 1 % Tween 40, führte stets zu einem Absterben der Bakterien. Eine kombinierte Zugabe verschiedenster kurz- (C4-/C6-Fettsäuren) und langkettiger Fettsäuren (C16-/C18-Fettsäuren) führte zu keiner Steigerung der Wachstumsrate und wurde daher nicht weiter verfolgt, obwohl kurz- und langkettige Fettsäuren bei gleichzeitiger Verfügbarkeit vom Organismus genutzt werden können (Slijkhuis 1983).

Für das Wachstum von *M. parvicella* in Reinkulturen stellten sich Glasflaschen oder normale Glaskolben, die leicht geschwenkt werden, als ideal heraus. Schikanekolben oder zu starkes Schütteln der Kulturen führten hingegen zu einem schlechteren Wachstum der Kulturen.

4.2 Isolierung der Zellwand von *Microthrix parvicella*

Für die Isolierung der Zellwand wurden die Bakterien, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, zunächst geerntet und die Zellen mit Hilfe einer French Press (SLM Instruments) aufgeknackt. Um die Cytoplasmamembran und die Zellwand voneinander zu trennen, wurde eine 16-stündige Sucrosegradientenzentrifugation durchgeführt. Es konnte eine Auftrennung der Membran und der Zellwand in den Sucrosegradientenschichten beobachtet werden (Abbildung 33). Insgesamt wurden 7 Fraktionen geerntet, bei denen insbesondere zwei Fraktionen aufgrund ihrer markanten Gelbfärbungen auffällig waren. Während Fraktion 3 hellgelb erschien, zeigte Fraktion 5 eine deutliche, dunkelgelbe Färbung, wodurch bereits erste Rückschlüsse auf die Lokalisation der Cytoplasmamembran beziehungsweise der Zellwand gezogen werden konnten.

	NADH-Oxidase Aktivität	Porenformende Aktivität
1	-	+
2	+	-
3	+++	-
4	++	+
5	-	+++
6	-	++
7	-	+

Abbildung 33: Ergebnisse der 16-stündigen Sucrosegradientenzentrifugation zur Bestimmung der verschiedenen Membranfraktionen mit NADH-Oxidase-Aktivität und zugehöriger Bilayer-Aktivität. Dazu wurde eine Sucrosegradientenzentrifugation mit Sucrosegehalten von 30 % (w/v, 3 ml), 50 % (w/v, 4 ml) und 70 % (w/v, 3 ml) durchgeführt. 7 Fraktionen wurden gesammelt. Fraktion 3 beinhaltet die höchste NADH-Oxidase-Aktivität, Fraktion 5 die höchste porenformende Aktivität.

Um die jeweiligen Fraktionen des Sucrosegradienten der Cytoplasmamembran beziehungsweise der Zellwand zuordnen zu können, wurden alle Fraktionen einem NADH-Oxidase-Aktivitätstest (Mizuno und Kageyama 1978) unterzogen. Die größte NADH-Oxidase-Aktivität konnte bei der hellgelben Fraktion 3 beobachtet werden, welche in etwa 34 % der gesamten NADH-Oxidase-Aktivität beinhaltet. Ebenfalls hohe Aktivität konnte bei den Fraktionen 2 und 4 beobachtet werden, die für 18 % beziehungsweise 25 % der NADH-Oxidase-Aktivität verantwortlich waren (Abbildung 33). Da diese 3 Fraktionen zusammen ca. 77 % der gesamten NADH-Oxidase-Aktivität beinhalteten, wurde die Cytoplasmamembran diesen Fraktionen zugeordnet.

Zusätzlich zum NADH-Oxidase-Aktivitätstest wurden alle Fraktionen des Sucrosegradienten auf porenformende Eigenschaften im Black Lipid Bilayer untersucht. Die größte Porenaktivität in Einzelkanalmessungen konnte dabei bei Messungen mit Fraktion 5 beobachtet werden. Die Messungen in 1 M Kaliumchlorid zeigten 3 Maxima bei 600 pS, 3 nS und bei 6 nS, was bedeutet, dass die Zellhülle von *M. parvicella* mindestens ein kanalformendes Protein besitzen muss. Dieses Protein ist wahrscheinlich in der Zellwand und nicht in der Cytoplasmamembran lokalisiert, da sonst der elektrochemische Gradient über der

Membran kollabieren würde. Die NADH-Oxidase-Inaktivität von Fraktion 5 war ein weiteres Indiz dafür, dass Fraktion 5 frei von Cytoplasmamembran war. Neben Fraktion 5 konnten auch bei den benachbarten Fraktionen 4, 6 und 7 erhöhte porenformende Eigenschaften im Black Lipid Bilayer festgestellt werden (Abbildung 33).

Die Ergebnisse zeigen, dass die NADH-Oxidase und die porenformenden Proteine in verschiedenen Fraktionen von *M. parvicella* lokalisiert sind. Weiterhin konnten die verschiedenen Fraktionen sicher der Cytoplasmamembran beziehungsweise der Zellwand zugeordnet werden. Die hellgelbe Fraktion 3 beinhaltete die Cytoplasmamembran, die dunkelgelbe Fraktion 5 die Zellwand. Da die Cytoplasmamembran in der oberen Fraktion 3 detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass diese eine geringere Dichte als die Zellwand besitzt und daher weniger stark durch die Sucrosegradientenschichten während der Zentrifugation wandert.

Zur Abschätzung des Proteingehalts der einzelnen Sucrosegradientenfraktionen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (s. Abschnitt 3.7). Abbildung 34 zeigt das dabei erhaltene Bandenmuster der einzelnen Fraktionen. Die mit Abstand höchste Proteinmenge konnte in Fraktion 5 des Sucrosegradienten gefunden werden, welche auch gleichzeitig die Zellwand enthielt.

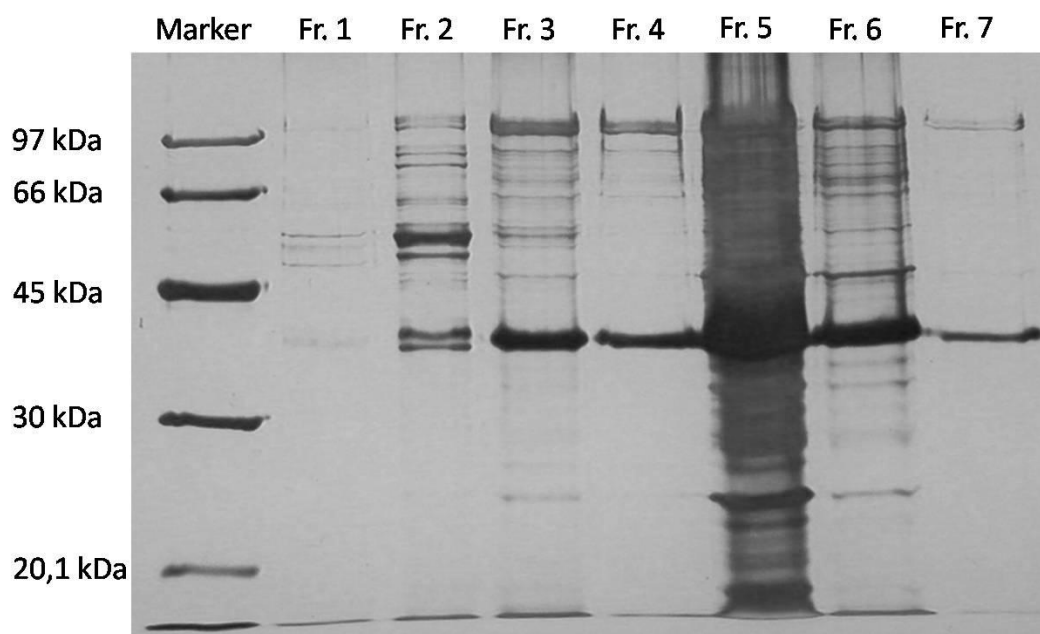


Abbildung 34: Proteinbandenmuster der verschiedenen Sucrosegradientenfraktionen, erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Dazu wurden jeweils 200 µl der Fraktionen nach Wessel und Flüge gefällt (Wessel und Flüge 1984) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.

4.3 Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Isolierungsschritte konnten verschiedene Membranproteine aus Fraktion 5 des Sucrosegradienten, welche die Zellwand enthielt, isoliert werden. Mehrfachwaschungen mit verschiedenen konzentrierten Puffern, Lösungen und Detergenzien (z.B. Tris HCl (pH8), LDAO, Genapol, Triton) führten zu einem Herauslösen der Membranproteine aus der Lipidmembran. Zur Bestimmung des jeweiligen Proteingehalts der einzelnen Waschschrte wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Nachfolgende Abbildung 35 zeigt das bei der SDS-PAGE erhaltene Proteinbandenmuster.

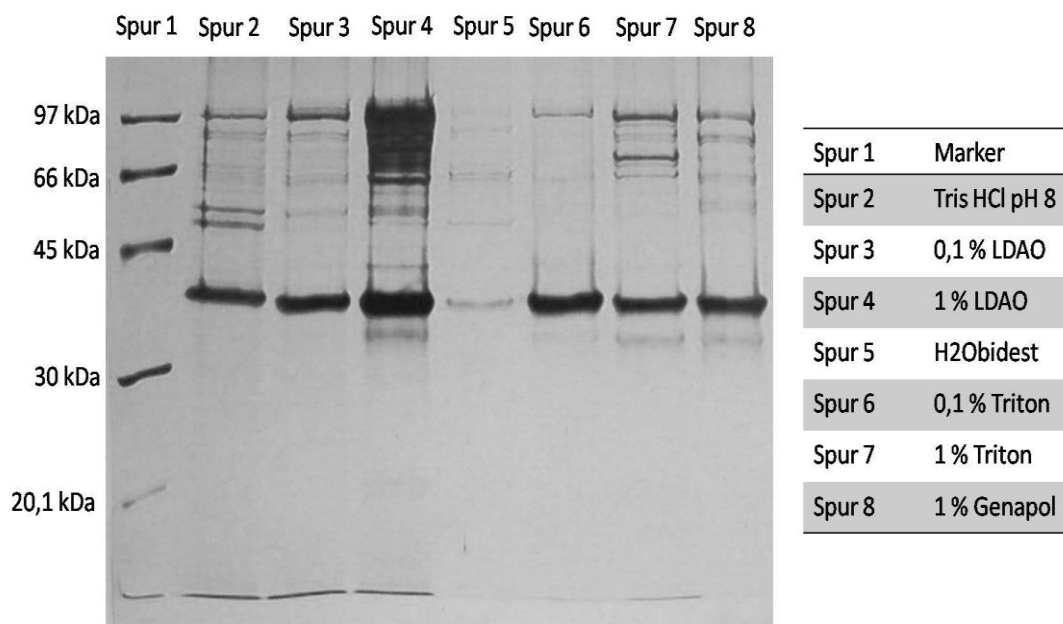


Abbildung 35: Proteinbandenmuster der einzelnen Waschschrte von Fraktion 5 des Sucrosegradienten, erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Dazu wurden jeweils 200 µl der einzelnen Waschschrte (s. Legende rechts) nach Wessel und Flügge gefällt (Wessel und Flügge 1984) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.

Wie man in Abbildung 35 erkennt, zeigten insbesondere die Waschschrte mit Detergenzien wie LDAO, Triton oder Genapol gute Ergebnisse. Die größten Proteinkonzentrationen wurden dabei bei Waschungen mit unterschiedlich konzentrierten Lauryldimethylaminoxid-Lösungen (LDAO) erzielt. Weitere Waschversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an LDAO (0,1 % - 3 % (v/v)) führten zu dem Ergebnis, dass eine Konzentration von 1 % (v/v)

LDAO zum Herauslösen der Membranproteine angestrebt werden sollte, da die Proteinausbeute bei 1 % (v/v) LDAO über der der Waschung mit 0,1 % (v/v) LDAO lag. Eine weitere Anhebung der LDAO-Konzentration auf beispielsweise 3 % (v/v) LDAO führte hingegen zu keiner erhöhten Proteinausbeute und wurde daher nicht für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen. Als Standarddetergenz für die weiteren Isolierungs- und Aufreinigungsschritte (z.B. bei der Fast Protein Liquid Chromatographie) wurde somit 1 % LDAO ausgewählt.

Um auszuschließen, dass durch die Detergenzbehandlung die porenformenden Eigenschaften der aus der Membran herausgelösten Proteine beeinträchtigt werden, wurden alle Detergenzwaschschritte durch Einzelkanalmessungen im Black Lipid Bilayer überprüft. Dabei konnte in allen Waschschritten mit Detergenzien eine Vielzahl von Kanälen festgestellt werden. Es gibt somit keine Einschränkungen gegenüber einer Behandlung der Membranproteine mit Detergenzien in Bezug auf die porenformenden Eigenschaften der Proteine.

Zur weiteren Auftrennung der Proteine wurde der Überstand nach der Detergenzienwaschung mit 1 % LDAO durch Nutzung einer Fast Protein Liquid Chromatography (Bio-Rad) über eine Anionenaustauschersäule (MonoQ 5/50 GL, GE Healthcare) aufgereinigt. Durch diese chromatographische Auftrennung sollten die unterschiedlichen Proteine gemäß ihrer Ladung voneinander getrennt werden. In Abbildung 36 ist der beispielhafte Verlauf eines solchen FPLC-Laufes mit einer Anionenaustauschersäule zu sehen. Dabei sind mehrere Protein-Peaks (siehe blaue Kurve) zu beobachten, die auf verschiedenste Proteinfractionen hinweisen. Wie aus Abbildung 36 ersichtlich, wurde während des Laufs der Messung die Ionenstärke sukzessive erhöht, sodass letztlich ein Salzgradient in der Säule aufgebaut werden konnte. Abschließend wurde der Anteil des Hochsalzpuffers in der Säule auf 100 % erhöht, sodass auch schwer lösliche Proteine von der Anionenaustauschersäule abgewaschen werden konnten.

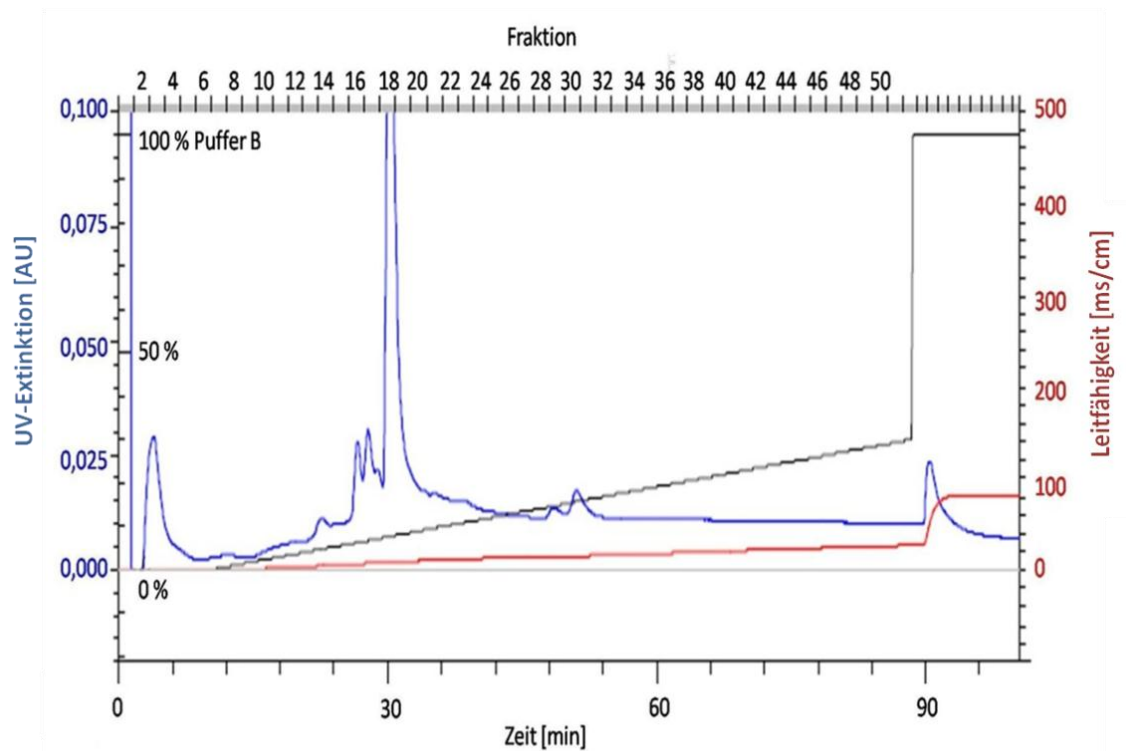


Abbildung 36: Typischer Verlauf des ersten FPLC-Laufes (Bio-Rad) mit einer Anionenaustauschersäule (MonoQ 5/50 GL, GE Healthcare). Aufgetragen auf die Säule wurde der Überstand der Detergenzienwaschung mit 1 % LDAO. Für das Anlegen eines Salzgradienten wurde eine 1 M Natriumchloridlösung mit 1 % LDAO verwendet, wodurch die Proteine gemäß ihrer Bindungsstärke zur Säulenmatrix von der Säule gewaschen wurden. Dies führte zu einer Separierung der Proteine. Die Peaks der blauen UV-Extinktionskurve weisen auf Proteinfraktionen hin. Die schwarz dargestellte Kurve entspricht dem entsprechenden Salzgradienten. Die rote Kurve beschreibt die real anliegende Leitfähigkeit.

Jeder Proteinpeak (blaue Kurve) des FPLC-Laufes wurde auf porenformende Eigenschaften im Black Lipid Bilayer überprüft und der jeweilige Proteingehalt der einzelnen Fraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE bestimmt. Die Proteinfraktion, die bei einem Salzgehalt von 70 mM NaCl (in Abbildung 36 die Fraktion Nummer 16) gesammelt wurde, zeigte dabei einen klaren und gleichmäßigen Einbau von Kanälen mit nur 2 Hauptleitfähigkeiten. Die Leitfähigkeiten betragen in 1 M Kaliumchlorid hauptsächlich 600 pS beziehungsweise 3 nS. Die Betrachtung des Proteingehalts dieser Fraktion durch SDS-PAGE zeigte eine voranschreitende Aufreinigung des gesuchten Proteins, da deutlich weniger Banden auf dem Polyacrylamidgel sichtbar waren als bei den vorhergehenden Aufreinigungsschritten, aber dennoch zeitgleich gute porenformende Eigenschaften beobachtet werden konnten. Ein typisches SDS-Gel des ersten FPLC-Schrittes ist in nachfolgender Abbildung 37 zu sehen. Aufgetragen auf das Gel

wurden 200 µl von Fraktion 16 des ersten FPLC-Laufes mit der Anionenaustauschersäule (gefällt nach Wessel und Flügge).

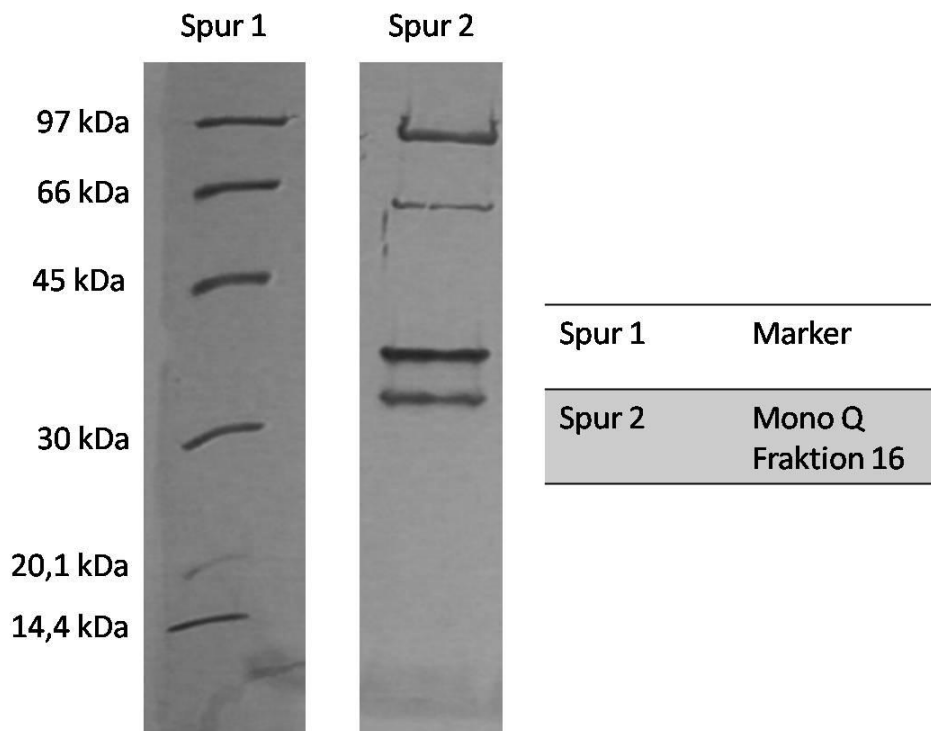


Abbildung 37: Proteinbandenmuster von Fraktion 16 des ersten FPLC-Laufes (MonoQ-Säule), erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Aufgetragen wurden 200 µl der Fraktion (gefällt nach Wessel und Flügge) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.

Da Fraktion 16 sehr gute porenformende Eigenschaften zeigte, jedoch immer noch mehrere Proteinbanden aufwies, wurde diese Proteinfraktion durch eine zusätzliche Fast Protein Liquid Chromatography weiter aufgereinigt. Dazu wurden die Proteine der Fraktion 16 durch eine Gelfiltration mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Superdex 75 10/300 GL-Säule, GE Healthcare) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Abbildung 38 zeigt einen typischen Verlauf eines solchen FPLC-Laufes mit angeschlossener Gelfiltrationssäule. Da im Gegensatz zur vorhergehenden Anionenaustauschersäule die Proteine bei einer Gelfiltrationssäule nicht an die Säulenmatrix binden, musste kein Hoch- und Niedrigsalzpuffer verwendet werden. Die Proteine wurden daher nicht durch den Puffer von der Säule abgewaschen, sondern vielmehr mit dem Waschpuffer durch die Gelfiltrationssäule hindurch transportiert. Dadurch blieb die real anliegende Salzkonzentration über den kompletten FPLC-Lauf hinweg konstant.

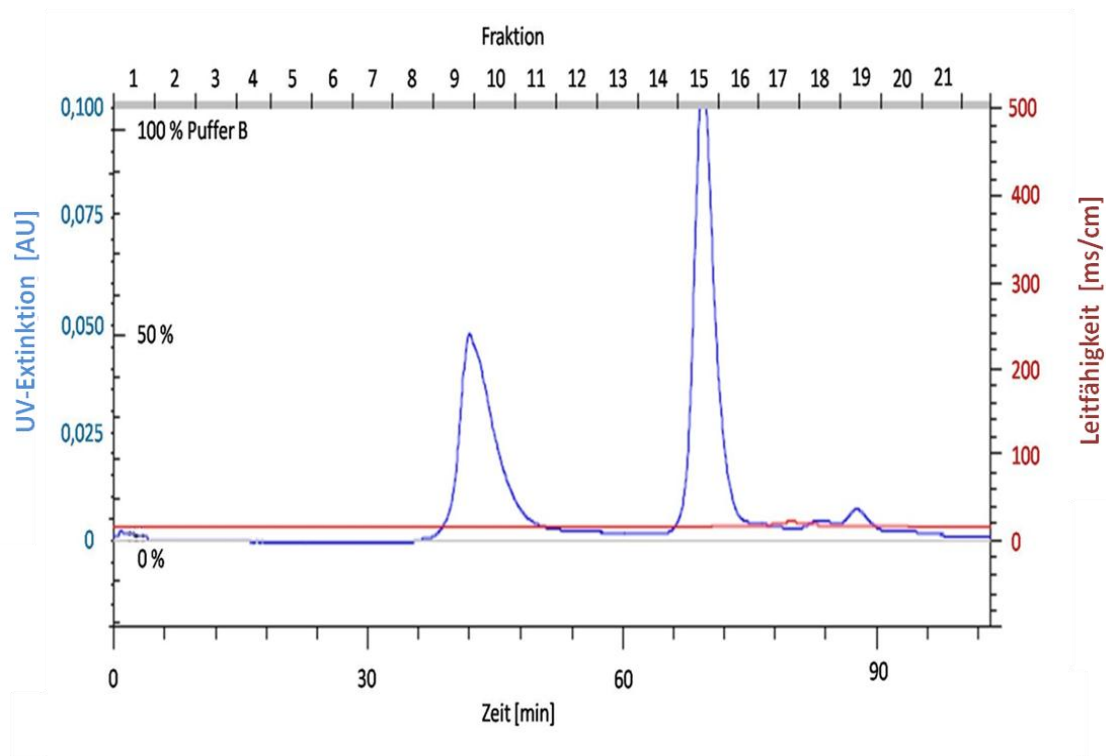


Abbildung 38: Typischer Verlauf des zusätzlichen FPLC-Laufes mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex 75 10/300 GL-Säule, GE Healthcare). Aufgetragen auf die Säule wurde Fraktion 16 des vorhergehenden FPLC-Laufes mit der Anionenaustauschersäule. Die Proteine durchwandern mit Hilfe des Waschpuffers unterschiedlich schnell die Diffusionssäule und werden daher in Abhängigkeit ihrer Größe voneinander separiert und gesammelt. Die Peaks der blauen UV-Extinktionskurve weisen auf Proteinfraktionen hin.

Vier Proteinfraktionen konnten durch den UV-Detektor der FPLC-Apparatur bei Gebrauch einer Superdex-Gelfiltrationssäule erfasst werden. Die 4 gesammelten Fraktionen bestätigten das Ergebnis der vorangegangenen Proteinbestimmung von Fraktion 16 des ersten FPLC-Laufes (s. Abbildung 37), bei der ein Bandenmuster mit ebenfalls 4 Proteinbanden detektiert werden konnte.

Alle 4 Fraktionen dieses Superdex-FPLC-Laufes wurden auf ihren Proteingehalt mittels SDS-PAGE (Abbildung 39) untersucht und die jeweiligen porenformenden Eigenschaften in künstlichen Lipidmembranen im Black Lipid Bilayer ermittelt. In der ersten Proteinfraktion konnten Proteine mit einem hohen Molekulargewicht von 75 bis 94 kDa detektiert werden. Die letzten beiden Proteinfraktionen des FPLC-Laufes enthielten Proteine mit Molekulargewichten kleiner 45 kDa. Diese Proteine zeigten bei Einzelkanalmessungen einen Einbau von Kanälen mit einer Leitfähigkeit von 3 nS und 6 nS bei 1 M Kaliumchlorid. Der Proteinpeak in Fraktion 15 beinhaltet ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60

kDa (siehe Abbildung 39), welches die höchste porenformende Aktivität im Bilayer zeigte und fast ausschließlich Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 600 pS formte (siehe nachfolgender Abschnitt 4.4). Diesem 60 kDa großen, porenformenden Protein wurde die Bezeichnung MppA für *Microthrix parvicella* porin A verliehen.

Parallele Versuche mit einer direkten Gelelektion dieser 60 kDa-Bande aus weniger aufgereinigten Proben (Ausschneiden der Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel, z.B. direkt nach der Detergenzienwaschung) führten ebenfalls zur Bildung dieser 600 pS großen Kanäle. Die Quantität und Qualität der Aufreinigung von MppA über eine alleinige Gelelektion waren jedoch nicht ausreichend, so dass daher eine Gelelektion üblicherweise nur zu Kontrollzwecken verwendet wurde. Vereinzelt (z.B. nach Auftragen einer zuvor eingefrorenen Proteinfraktion) konnte neben der 60 kDa-Bande eine zusätzliche zweite Bande auf dem Gel bei ca. 52 kDa beobachtet werden.

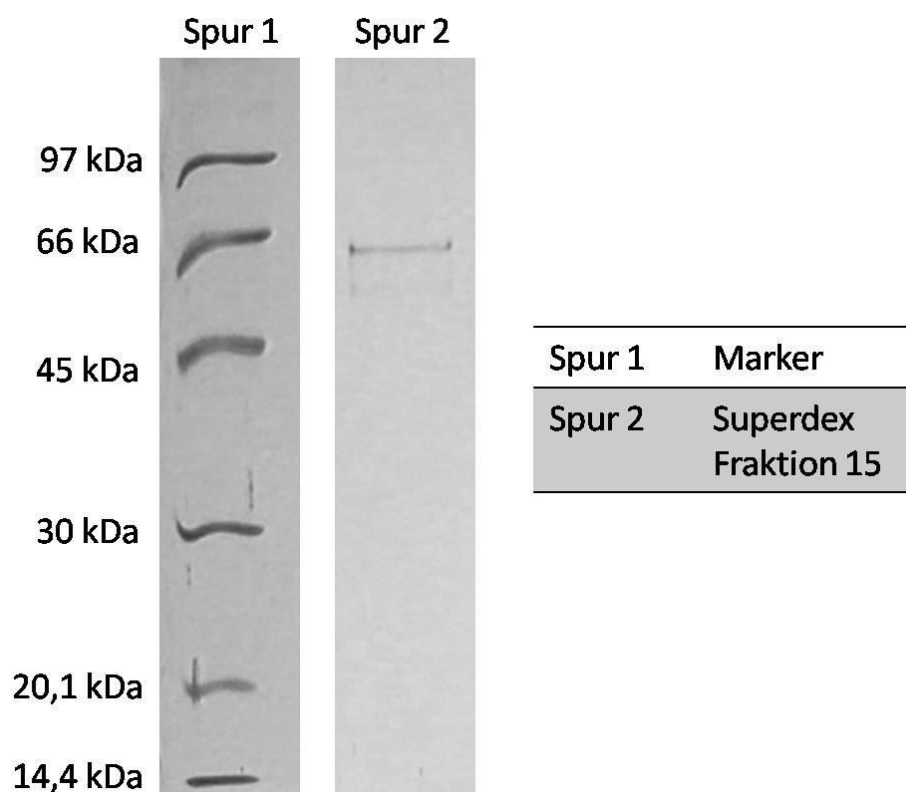


Abbildung 39: Proteinbandenmuster von Fraktion 15 des zusätzlichen Gelfiltrationslaufes (Superdex 75 10/300 GL-Säule, GE Healthcare), erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Aufgetragen wurden 200 µl der Superdex-Fraktion 15 (gefällt nach Wessel und Flügge). Zusätzlich wurde die Probe vor Befüllen der Geltaschen zur Denaturierung der Proteine für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.

4.4 Einzelkanalmessungen eines Porins von *Microthrix parvicella*

Das kanalformende Protein MppA aus *Microthrix parvicella* wurde durch Rekonstitution in künstlichen, schwarzen Lipidmembranen detailliert untersucht. Nach Zugabe des aufgereinigten MppA in geringen Konzentrationen zu einer oder zu beiden Seiten der Membran in schwarzem Zustand (bimolekulare Schicht) konnte der typische, stufenartige Anstieg des Membranstroms beobachtet werden. Einzelne Proteine rekonstituierten sich in der Membran zu einem kanalartigen Durchlass und konnten als Einzelkanaleinbau detektiert werden (Abbildung 40). Die Zugabe des aufgereinigten Proteins nur zur *cis*-Seite beziehungsweise nur zur *trans*-Seite der Membran zeigte keine signifikanten Unterschiede in der porenformenden Aktivität des Proteins aus *M. parvicella*.

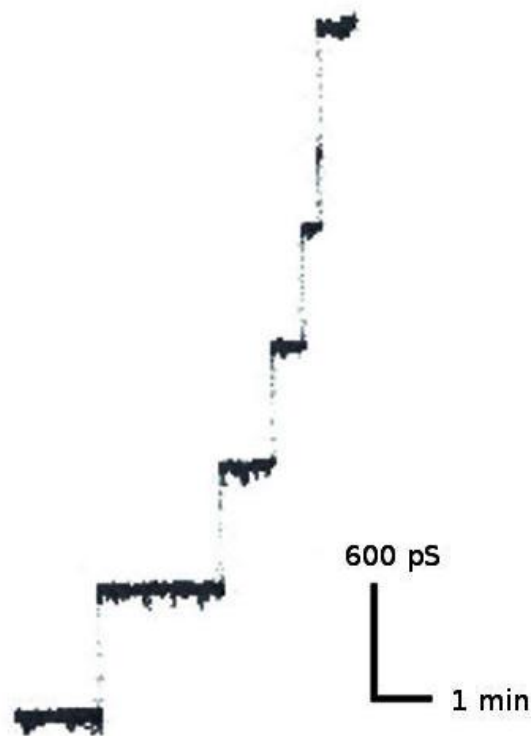


Abbildung 40: Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 1 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Jeder schrittweise Anstieg in der Leitfähigkeit steht dabei für ein Rekonstitutionsereignis des Porins. Die mittlere Einzelkanalleitfähigkeit bei 167 Ereignissen lag bei ca. 600 pS.

Wie aus Abbildung 40 ersichtlich, konnte der Einbau einzelner MppA-Kanäle in Form gut definierter Schritte des Leitfähigkeitsanstieges detektiert werden. Die Visualisierung über den Schreiberausdruck führte zu einem treppenartigen Muster. Die Höhe einer „Treppenstufe“ entsprach dabei der Leitfähigkeit G , die Länge der „Stufe“ dem zeitlichen Verlauf der Messung.

In einer 1 M Kaliumchloridlösung konnte bei einer angelegten Spannung von 20 mV im Black Lipid Bilayer eine Hauptleitfähigkeit G von 600 pS für MppA beobachtet werden. Gleichzeitig konnte eine zweite, seltener auftretende Leitfähigkeit von 300 pS unter den angegebenen Messbedingungen detektiert werden. Der Einbau dieser selten auftretenden 300 pS-Einzelkanäle trat direkt zu Beginn der Messung nach der Zugabe von MppA zusammen mit der Hauptleitfähigkeit von 600 pS am häufigsten auf. Über die Dauer der Messung hinweg nahm die Häufigkeit der 300 pS-Kanäle stetig ab, sodass im weiteren zeitlichen Verlauf nur noch Rekonstitutionsereignisse mit einer Leitfähigkeit von 600 pS beobachtet werden konnten. Ein stärker werdendes Rauschen des Signals bei länger andauernden Messungen konnte nicht festgestellt werden. Lediglich die Quantität der Kanaleinbauten in die Membran nahm mit der Dauer der Messung ab.

Zur Auswertung der in Abbildung 40 dargestellten Einzelkanalereignisse wurde die Häufigkeit der einzelnen Leitfähigkeiten statistisch bestimmt. Diese statistische Auswertung der Einzelkanalmessung ist in Form eines Histogramms in Abbildung 41 dargestellt. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden mindestens 100 Ereignisse erfasst und ausgezählt (in Abbildung 41 beispielsweise 167 Einzelkanalrekonstitutionen). Wie bereits beschrieben, trat neben einer Hauptleitfähigkeit von 600 pS, die bei etwa 35 % der Einbauereignisse gemessen werden konnte, unter gewissen Umständen eine zweite Leitfähigkeiten von 300 pS auf, was insbesondere in der graphischen Auswertung sichtbar wird. Aufgetragen sind dabei die gemessene Leitfähigkeit G sowie die dazugehörige Wahrscheinlichkeit $P(G)$.

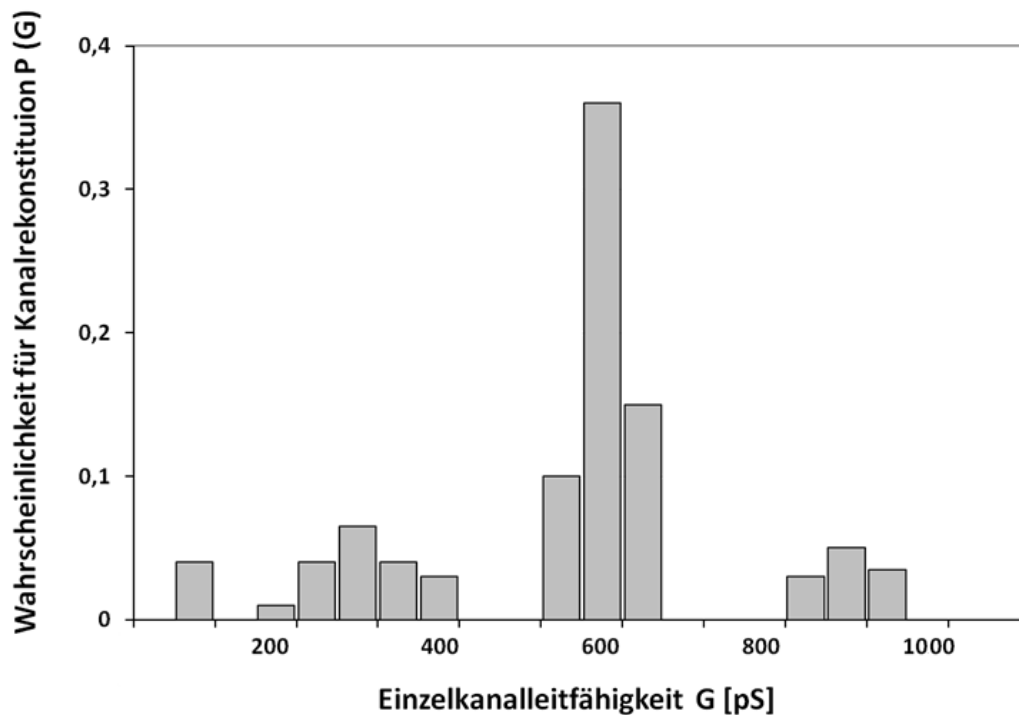


Abbildung 41: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des aufgereinigten Porins MppA von *M. parvicella*. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/n-Dekano-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 1 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 167 MppA-Kanalrekonstitutionen betrug ca. 600 pS.

Zur detaillierten Charakterisierung des porenformenden Proteins MppA aus *M. parvicella* wurden Einzelkanalmessungen im Black Lipid Bilayer als Funktion unterschiedlicher Kaliumchloridkonzentrationen (0,1 M, 0,3 M, 1 M und 3 M) und unterschiedlicher Elektrolyte (u.a. Lithiumchlorid und Kaliumacetat) untersucht. Zur statistischen Auswertung der Leitfähigkeiten wurden für jede Messung mehr als 100 rekonstituierte Kanäle in der Membran erfasst und ausgezählt, um eine durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit zu erhalten. Abbildung 42 und Abbildung 43 zeigen die statistische Auswertung des Einzelkanaleinbaus von MppA in künstlichen Lipidemembranen bei Verwendung von 0,3 M und 3 M Kaliumchloridlösungen als Elektrolyt.

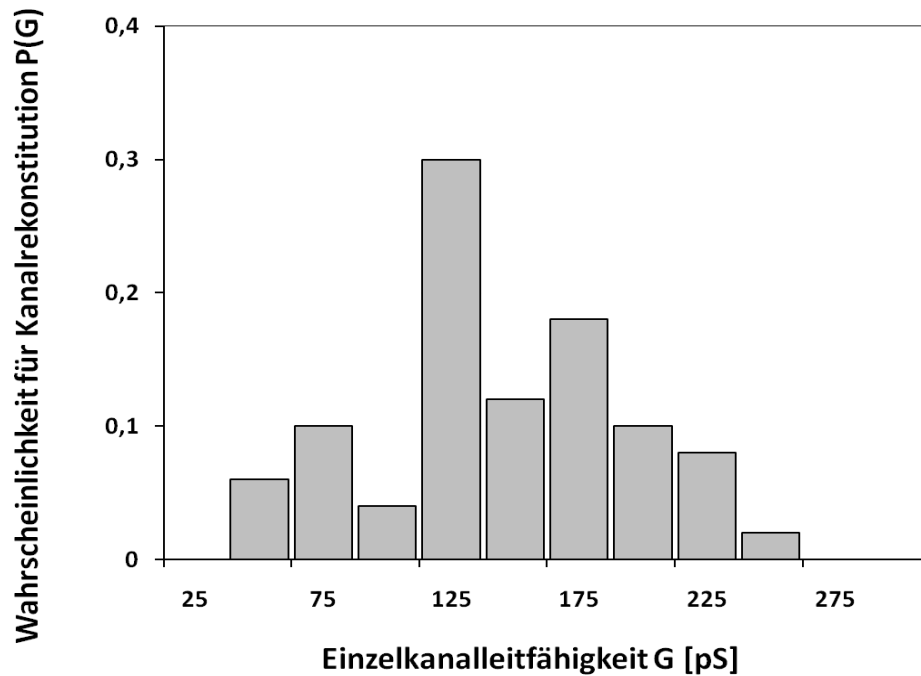


Abbildung 42: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des Porins MppA. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 0,3 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 134 Kanalrekonstitutionen betrug 125 pS.

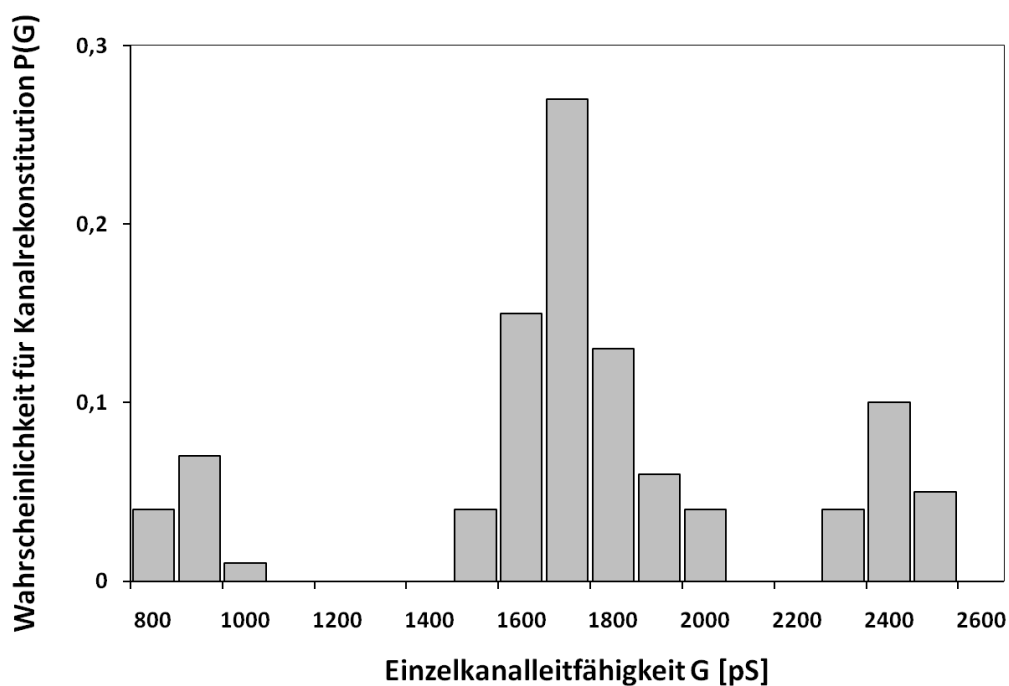


Abbildung 43: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des Porins MppA. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 3 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 146 Kanalrekonstitutionen betrug 1700 pS.

Wie aus den beiden Histogrammen ersichtlich, konnte für eine Kaliumchloridkonzentration von 0,3 M bzw. 3 M ein Einbau von MppA in die Lipidmembran gemessen werden. Wie zu erwarten, nahm die Hauptleitfähigkeit von MppA bei einer Verringerung der Elektrolytkonzentration im Vergleich zur Messung mit 1 M Kaliumchlorid ab (ca. 125 pS bei 0,3 M Kaliumchlorid), während die Leitfähigkeit bei einer Erhöhung der Elektrolytkonzentration zunahm (ca. 1700 pS bei 3 M Kaliumchlorid).

Bei weiteren Messungen in 0,1 M Kaliumchloridlösung konnte nur ein sehr geringer Einbau von Kanälen in die Lipidmembran beobachtet werden. Dies liegt wahrscheinlich in der hohen Ladungsdichte auf der Oberfläche von MppA begründet, welche zu einer Blockierung des Kanalrekonstitutionsprozesses bei niedrigen Ionenstärken tendieren könnte. Für weitere Experimente in dieser Arbeit (z.B. für die Bestimmung der Selektivität von MppA) wurde daher die Salzkonzentration auf mindestens 0,3 M angehoben, da ein Einbau von mehr als 100 Kanälen zur statistischen Absicherung nicht in einem angemessenen Zeitraum möglich war. Die jeweils häufigste Leitfähigkeit von MppA bei der Messung in unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen ist tabellarisch noch einmal in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Hauptleitfähigkeiten von MppA bei der Messung in unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/n-Dekan-Membranen gegeben und die Messung in jeweils ungepufferter KCl-Lösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Zur statistischen Absicherung wurden mindestens 100 Einzelkanalereignisse ausgezählt.

Kaliumchloridkonzentration (M)	Durchschnittliche Leitfähigkeit (pS)
0,1 M KCl	*
0,3 M KCl	125 pS
1,0 M KCl	600 pS
3,0 M KCl	1700 pS

* keine statistische Auswertung möglich

Die durchgeführten Messungen der Einzelkanalleitfähigkeit in verschiedenen Kaliumchloridkonzentrationen zeigten, dass die Einzelkanalleitfähigkeit von MppA näherungsweise eine lineare Funktion der Elektrolytkonzentration beschrieb (siehe Tabelle 2). Mit Zunahme der Elektrolytkonzentration konnte auch eine Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Linearität der Leitfähigkeit, d.h. die Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen Kaliumchloridkonzentration, ist in Abbildung 44 noch einmal graphisch dargestellt.

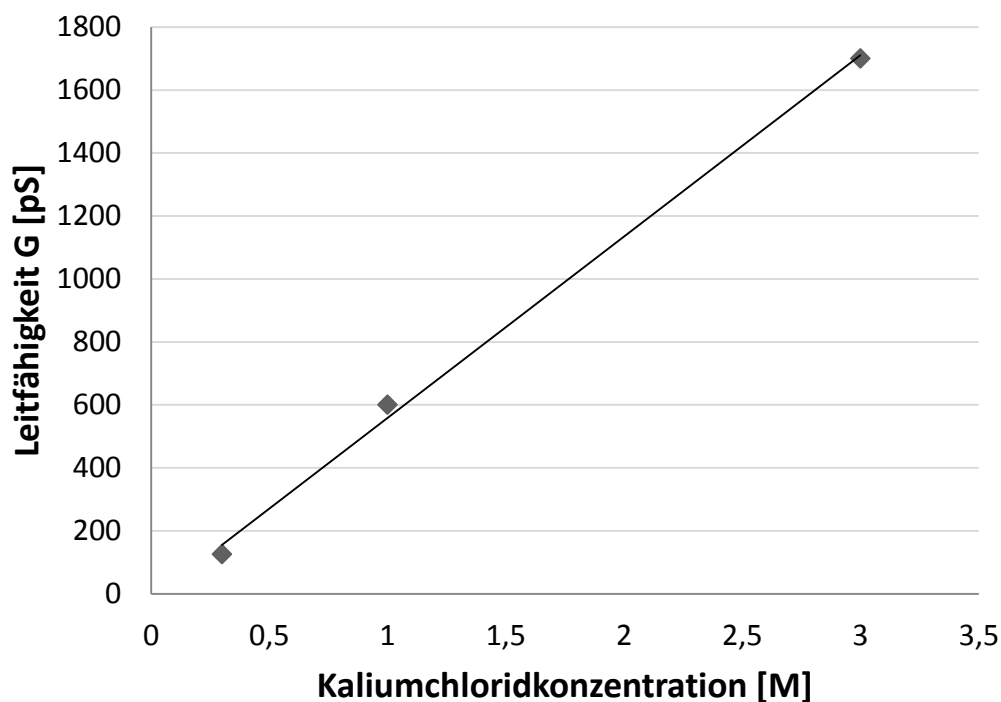


Abbildung 44: Lineare Abhängigkeit der Leitfähigkeit des Kanals MppA von der Kaliumchloridkonzentration. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membranen gegeben und die Messungen in jeweils ungepufferter Elektrolytlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt.

Zusätzliche Rückschlüsse über die Ionenselektivität von MppA konnten aus Einzelkanalexperimenten in unterschiedlichen Elektrolytlösungen gezogen werden. Gemessen wurde neben Kaliumchloridlösungen auch Lithiumchlorid- und Kaliumacetatlösungen, wodurch einmal das Kation (Kalium gegen Lithium) und einmal das Anion (Chlorid gegen Acetat) gegen weniger mobile Ionen ausgetauscht wurden. Dadurch konnte der Einfluss der

verschiedenen Ionensorten näher bestimmt werden. Die Ergebnisse der Messungen von MppA in unterschiedlichen Elektrolyten sind in nachfolgender Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Einfluss des Elektrolyts auf die Leitfähigkeit des Kanals MppA von *Microthrix parvicella*. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membranen gegeben und die Messung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt.

Elektrolyt	Leitfähigkeit (pS)
1 M KCl	600 pS
1 M LiCl	280 pS
1 M KAc (pH 7)	290 pS

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, zeigten sowohl die Kationen als auch die Anionen eine gewisse Permeabilität durch den Kanal gemäß ihrer Mobilität in wässriger Phase. Durch Austauschen des jeweiligen Kations (K^+) beziehungsweise Anions (Cl^-) der Elektrolytlösung gegen ein weniger mobiles Ion (Li^+ beziehungsweise CH_3COO^-) konnte eine Abnahme der Leitfähigkeit festgestellt werden. Die beiden Leitfähigkeiten für 1 M LiCl und 1 M KAc lagen in etwa auf gleichem Niveau, jedoch deutlich unter der Leitfähigkeit von MppA bei der Messung in 1 M Kaliumchlorid. Dies bedeutet, dass MppA, wenn überhaupt, nur eine geringe Selektivität für gewisse Ionen aufweist.

4.5 Selektivität von MppA

Zur Ermittlung eventueller Selektivitäten des Porins MppA von *Microthrix parvicella* wurde das jeweilige Membranpotenzial bei nicht angelegter Spannung im Black Lipid Bilayer gemessen. Dazu wurde nach dem Einbau von mehr als 100 MppA-Kanälen in eine schwarze Lipidmembran die Ausgangssalzkonzentration von 0,3 M Kaliumchlorid durch Zugabe von 3 M Kaliumchloridlösung auf der *cis*-Seite der Membran angehoben. Das einseitige Anheben der Kaliumchloridkonzentration führte dabei zur Etablierung eines Salzgradienten über der Membran. Somit konnte nach jeder Zugabe das konstant werdende Membranpotenzial bei nicht angelegter Spannung bestimmt werden.

Nach dem Anlegen eines Salzgradienten durch die einseitige Zugabe von 3 M Kaliumchloridlösung wurde die verdünntere Seite der Membran (0,3 M) mit + 2,46 mV stets leicht positiv (Tabelle 8).

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Benz et al. 1979) konnte das jeweilige Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Anionen (P_k/P_a) ermittelt werden. Der errechnete Permeabilitätskoeffizient betrug dabei für Kaliumchlorid 1,2 (Tabelle 8). Dies bedeutet, dass der Kanal leicht permeabler für Kationen als für Anionen war. Die Bestimmung des Permeabilitätsverhältnisses von Kationen zu Anionen bestätigte somit die Vermutung, dass MppA, wenn überhaupt, nur eine geringe Ionenselektivität aufweist.

4.6 Spannungsabhängigkeit von MppA

Zur Messung einer eventuellen Spannungsabhängigkeit des aufgereinigten Porins MppA wurden Multikanalexperimente im Black Lipid Bilayer durchgeführt. Dabei sollte ein mögliches Schließen der Kanäle in Abhängigkeit der angelegten Spannung untersucht werden.

Nach einseitigem Einbau von mehr als 100 Poren in die künstliche Lipidmembran wurden alternierend steigende positive und negative Spannungen angelegt. Abbildung 45 zeigt den typischen Verlauf einer Messung mit *cis*-seitig zugegebenem MppA, bei der Spannungen von - 70 mV bis + 70 mV abwechselnd angelegt wurden.

Wie man Abbildung 45 entnehmen kann, konnte bereits bei Spannungen größer + 20 mV beziehungsweise kleiner - 20 mV eine Abnahme der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Abnahme der Leitfähigkeiten bei der jeweiligen angelegten Spannung war im positiven und negativen Bereich nur leicht unterschiedlich ausgeprägt. Es konnte kein Unterschied zwischen *cis*- und *trans*-seitiger Zugabe festgestellt werden

Die maximale Abnahme der Leitfähigkeit konnte bei einer angelegten Spannung von 70 mV beobachtet werden, bei der die Abnahme ca. 60 % betrug. Höhere Spannungen konnten nicht gemessen werden, da bei angelegten Spannungen größer 90 mV die Lipidmembran stets riss.

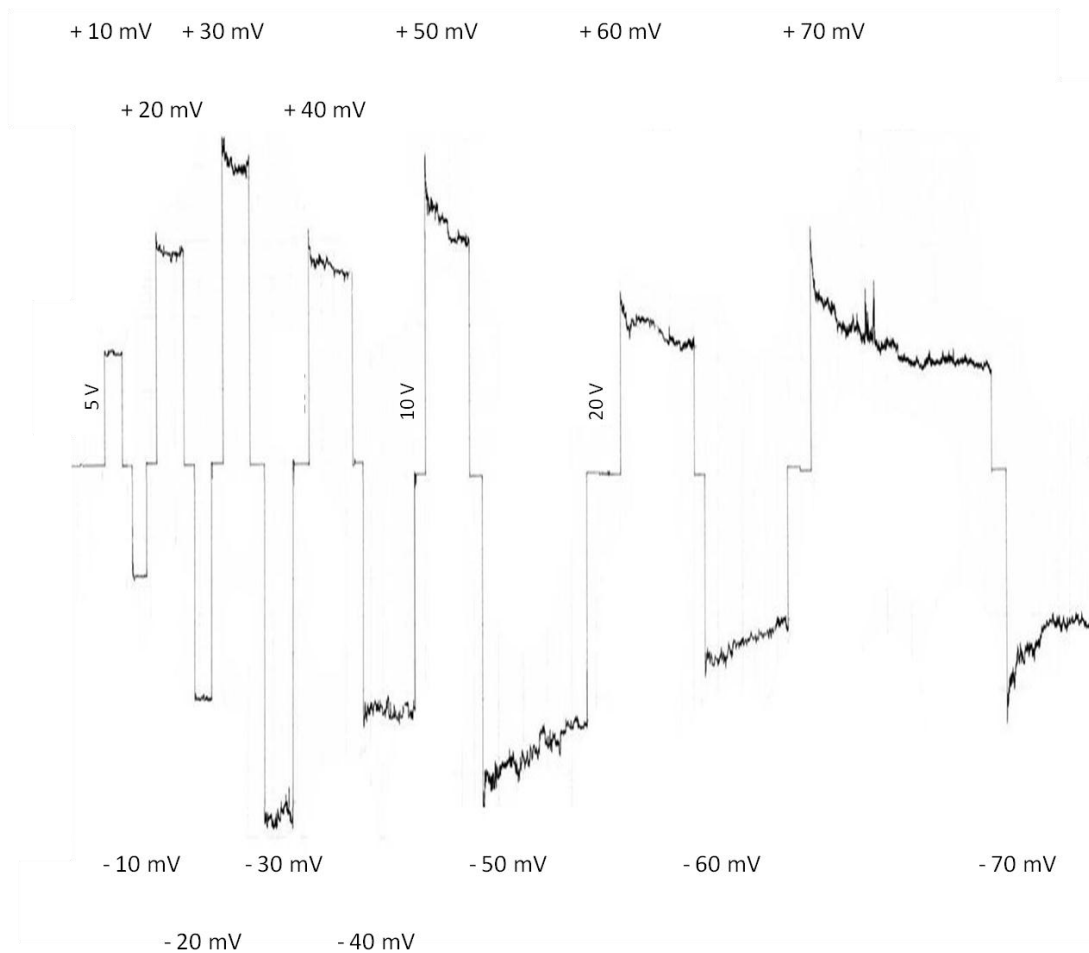


Abbildung 45: Beispiel für eine Messung der Spannungsabhängigkeit von *cis*-seitig zugegebenem MppA bei angelegten Spannungen von + 70 mV bis – 70 mV. Die horizontalen Angaben in mV entsprechen den jeweils angelegten Spannungen, die vertikalen Angaben in Volt entsprechen dem full scale. Bereits bei einer angelegten Spannung von + 20 beziehungsweise - 20 mV konnte ein Schließen von MppA in Form eines Leitfähigkeitsrückganges festgestellt werden.

Zur Auswertung der Messung wurde das Verhältnis der gemessenen Leitfähigkeit G zur Ausgangsleitfähigkeit G_0 bei der jeweils angelegten Spannung V_m aufgetragen. Das Ergebnis dieser Auftragung ist in Abbildung 46 zu sehen und zeigt eine charakteristische Glockenkurve.

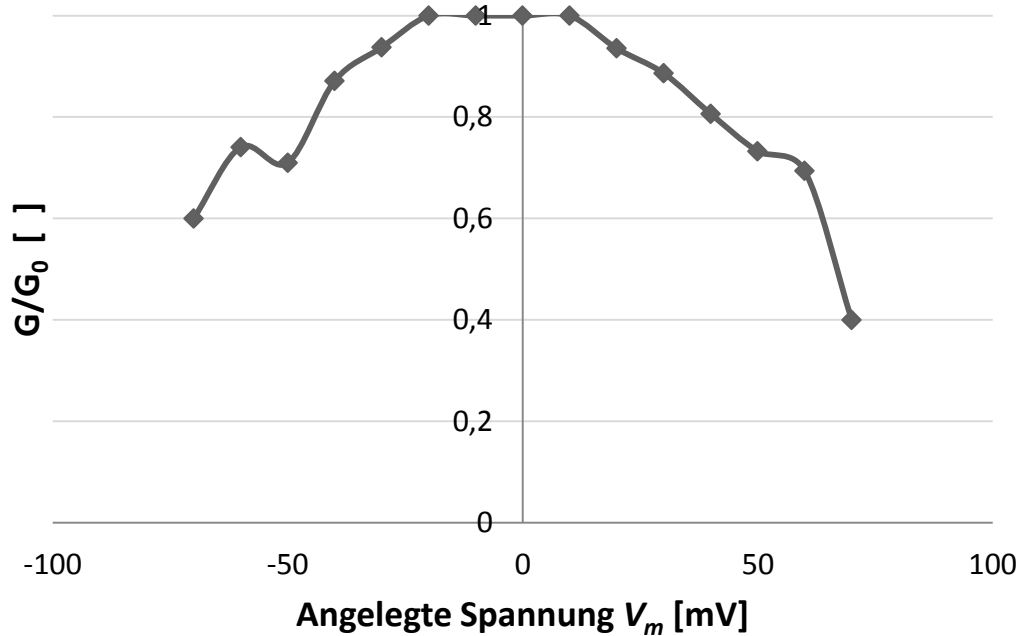


Abbildung 46: Graphische Auswertung einer Messung der Spannungsabhängigkeit von *cis*-seitig zugegebenem MppA. Aufgetragen ist das Verhältnis der gemessenen Leitfähigkeit G zur Ausgangsleitfähigkeit G_0 bei der jeweils angelegten Spannung V_m . Zu erkennen ist eine typische Glockenkurve mit Schließvorgängen bei angelegter positiver und auch bei angelegter negativer Spannung.

4.7 Bindungsmessungen mit Hilfe der Titrationsmethode

Wie bereits beschrieben, betrug die Einzelkanalleitfähigkeit von MppA 600 pS in ungepufferter 1 M Kaliumchloridlösung. Die niedrige Leitfähigkeit ließ vermuten, dass der Kanal spezifisch für bestimmte Substrate sein könnte, da solch niedrige Einzelkanalleitfähigkeiten typisch für Proteine mit einer Bindestelle im Kanal sind. Beispiele hierfür sind die *Escherichia coli*-Kanäle LamB und Tsx (Ferenci et al. 1980; Benz et al. 1986; Maier et al. 1988; Benz 2001).

Bindungsexperimente mit MppA sollten darüber Aufschluss geben, ob eine Bindestelle für spezifische Substrate in den Kanälen vorhanden ist, welche durch das aufgereinigte Protein MppA von *Microthrix parvicella* geformt werden. Die Bindungsexperimente wurden bereits hinreichend für Messungen von LamB mit Kohlenhydraten beschrieben (Benz et al. 1986; Benz et al. 1987).

Zunächst wurde die Bindung von Substanzen an die Bindestelle von MppA mit Hilfe von handelsüblichen Flockungs- und Fällungsmitteln überprüft. Dazu wurde der jeweilige pH-

Wert der verschiedenen Lösungen durch Zugabe von Natronlauge auf einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,5 angehoben, um ein Reißen der Membran zu verhindern, da die Lösungen üblicherweise einen stark sauren pH-Wert ($\text{pH} \leq 1$) aufweisen. Da es durch das Anheben des pH-Wertes zu einem Ausfallen der Metallsalze kam, wurden die Lösungen zunächst 1 zu 10 beziehungsweise 1 zu 100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach einem gesättigten Einbau von mehr als hundert Poren in die künstliche Lipidmembran, d.h. zum Zeitpunkt, als die Einbau- und Ausbauhäufigkeit von MppA gleich groß war, wurden die zu untersuchenden Fäll- und Flockungsmittel in gleichen Teilen zu beiden Seiten der Membran in steigenden Konzentrationen hinzugefügt. Eine Blockierung des Kanals in Form einer Bindung der Substanzen an die Bindestelle im Kanal wurde durch die jeweilige Abnahme der Leitfähigkeit nach der Zugabe detektiert (Abbildung 47).

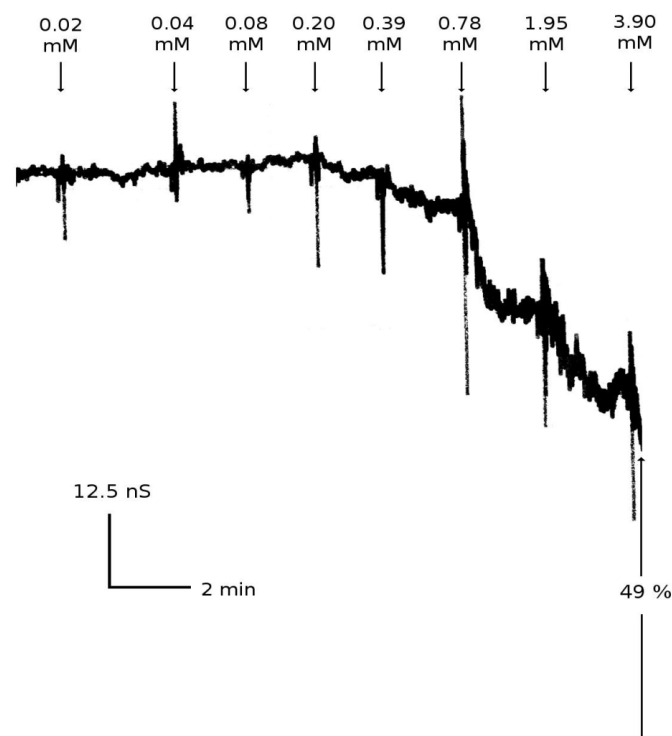


Abbildung 47: Titration mit dem Fäll- und Flockungsmittel Steinfloc FT (1:100, pH 5,4). Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Steinfloc FT wurde nach Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei ab einer Zugabe von mindestens 0,2 mM Steinfloc FT detektiert werden. Am Ende der Messung entsprach die gemessene Leitfähigkeit in etwa der Hälfte der Ausgangsleitfähigkeit.

Bei der in Abbildung 47 dargestellten Messung wurde in steigenden Konzentrationen eine verdünnte Lösung (1:100) des Flockungsmittels Steinfloc FT (pH 5,4) zu der Elektrolytlösung gegeben. Bereits ab einer Konzentration von 0,2 mM Steinfloc FT konnte eine Abnahme der Leitfähigkeit beobachtet werden, d.h. es hat eine Bindung von Bestandteilen der Lösungen an die Bindestelle von MppA bereits bei niedrigen Substratkonzentrationen stattgefunden.

Da die genauen Konzentrationsverhältnisse der im Handel erhältlichen Flockungs- und Fällungsmittel wie Steinfloc FT, Steinfloc PAC 060 oder Südflock K2 aufgrund der durch den Produktionsprozess bedingten Verunreinigungen nicht bekannt sind, wurden die Molaritäten der Ausgangslösungen nur gemäß den ungefähren Herstellerangaben bestimmt. Tabelle 4 zeigt beispielhaft die sich aus den Messungen ergebenden Bindekonstanten für drei der untersuchten kommerziellen Fäll- und Flockungsmittel.

Tabelle 4: Bestimmung der Bindekonstanten für drei ausgewählte, handelsübliche Fäll- und Flockungsmittel. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH ca. 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden.

Untersuchte Lösung	Konzentration [mM]	Bindekonstante [M ⁻¹]
Steinfloc PAC 060 1:100, pH 5,4 Polyaluminiumhydroxidchlorid (6 % Al)	27,8 *	700 ± 150
1:100 Steinfloc FT 1:100, pH 5,4 Aluminiumsulfat (3.3 % Al) und Eisen (III) chlorid (1.5 % Fe)	19,5 *	280 ± 75
Südflock K2 1:100, pH 5,4 Aluminiumchlorid (9.5 % Al) und Eisen (III) chlorid (3 % Fe)	10,9 *	245 ± 45

* Konzentrationen bezogen auf den Aluminium und Eisenanteil der komplexen Lösungen.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, konnte bei allen untersuchten kommerziellen Fäll- und Flockungsmitteln eine Bindung festgestellt werden. Allen untersuchten Mitteln war dabei gemein, dass sie verschieden große Anteile an Eisen und/oder Aluminiumverbindungen beinhalteten. Die größte Bindung in MppA wurde für verdünntes Steinfloc PAC 060 (pH 5.4) mit Bindekonstanten von 700 M^{-1} festgestellt.

Zusätzlich zur Bestimmung der Bindekonstanten wurde die maximale Abnahme der Leitfähigkeit bestimmt, d.h. es wurde untersucht, wie weit die jeweiligen Kanäle geschlossen werden konnten. Die maximale Abnahme der Leitfähigkeit ist insofern von Bedeutung, da dieser Messwert letztendlich eine Aussage über das Maß der Blockierung der Kanäle zulässt. Die Ergebnisse der Bestimmung der maximalen Abnahme der Leitfähigkeit sind für die Titrationen saurer Metalllösungen in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Bestimmung der maximalen Leitfähigkeitsabnahme für drei ausgewählte, handelsübliche Fäll- und Flockungsmittel. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine Abnahme der Leitfähigkeit konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Untersuchte Lösung	Konzentration [mM]	Maximale Abnahme der Leitfähigkeit [%]
Steinfloc PAC 060 1:100, pH 5,4 Polyaluminiumhydroxidchlorid (6 % Al)	27,8 *	42 ± 4.0
1:100 Steinfloc FT 1:100, pH 5,4 Aluminiumsulfat (3.3 % Al) und Eisen (III) chlorid (1.5 % Fe)	19,5 *	55 ± 4.5
Südflock K2 1:100, pH 5,4 Aluminiumchlorid (9.5 % Al) und Eisen (III) chlorid (3 % Fe)	10,9 *	51 ± 2.0

* Konzentrationen bezogen auf den Aluminium und Eisenanteil der komplexen Lösungen.

Alle in Tabelle 5 aufgelisteten Lösungen zeigten eine ähnlich starke maximale Abnahme der Leitfähigkeit nach saurer Zugabe, d.h. es konnte kein Unterschied in der maximalen Kanalblockierung bei den unterschiedlichen Lösungen festgestellt werden.

Um auszuschließen, dass ein Verdünnungseffekt der Elektrolytkonzentrationen durch die verschiedenen Lösungszugaben zur Abnahme der gemessenen Leitfähigkeit von MppA führte, wurde die Leitfähigkeit vor und nach der Titrationsmessung mit Hilfe einer Leitfähigkeitsmesssonde bestimmt. Dabei konnte keine signifikante Änderung der Leitfähigkeit der Lösung festgestellt werden. Ein Verdünnungseffekt der Elektrolytlösung als Folge der Zugabe der zu untersuchenden Lösungen scheidet somit als Ursache für die Leitfähigkeitsabnahme in den Titrationsmessungen aus. Vielmehr muss es sich wie vermutet um einen Bindungseffekt im Kanal handeln.

Bei weiteren Bindungsmessungen mit MppA wurden die bereits vorher gemessenen kommerziellen Fäll- und Flockungsmittel durch Zugabe von Natronlauge auf neutrale pH-Werte beziehungsweise alkalische pH-Werte (pH 9-10) angehoben. Dabei konnte bei den Titrationsmessungen weder bei neutralen noch bei alkalischen pH-Werten eine Abnahme der Leitfähigkeit von MppA nach Zugabe der Lösungen festgestellt werden. Auch bei Zugabe von sehr hohen Mengen an Titrationslösungen blieb die Leitfähigkeit über die gesamte Messung nahezu konstant. Daher können diese Titrationsmessungen ebenfalls als Kontrollversuche dafür angesehen werden, dass für die vorher gemessenen Abnahmen der Leitfähigkeit kein Verdünnungseffekt verantwortlich war, sondern vielmehr eine Bindung bestimmter Substanzen an die Bindestelle von MppA stattgefunden hat.

Zur Kontrolle, dass die Abnahme der Leitfähigkeit von MppA bei den Titrationsexperimenten nicht allein ein Effekt des Absenkens des pH-Wertes der Elektrolytlösungen war, wurde eine zusätzliche Messung mit 1 M Salzsäure als Titrationslösung, d.h. ohne die Anwesenheit anderer Substanzen, durchgeführt. Dabei wurde die Säure in steigenden Konzentrationen solange zur vorgelegten Elektrolytlösung hinzugegeben, bis es zu einem Reißen der Membran kam.

Bei der Kontrollmessung mit Salzsäure konnte keine signifikante Abnahme der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Leitfähigkeitsabnahme ist somit kein Effekt des pH-Wertes an sich auf den Kanal, sondern vielmehr eine Folge der Bindung der Substrate im Kanal. Zusätzlich zeigte die Messung, dass die zu titrierende Lösung stets auf einen pH-Wert größer 4 eingestellt werden muss, da es sonst aufgrund des niedrigen pH-Wertes zu einem Reißen der Membran kommen kann und somit die Messung eventuell nicht vollständig durchgeführt werden kann.

Zur genauen Überprüfung, welche Einzelkomponenten beziehungsweise Einzelbestandteile der untersuchten, kommerziellen Flockungs- und Fällungsmittel im Black Lipid Bilayer konkret für die Abnahme der gemessenen Leitfähigkeit verantwortlich sind, wurden Bindungsexperimente mit den einzelnen Komponenten der Lösungen durchgeführt. Untersucht wurden dabei insbesondere die Effekte, welche durch den Austausch des jeweiligen Kations beziehungsweise des Anions hervorgerufen wurden. Dadurch sollte die eigentliche Wirksubstanz eingegrenzt und näher bestimmt werden.

Wie man Abbildung 48 entnehmen kann, konnte auch bei Zugabe der Einzelkomponenten (in diesem Falle Eisenchlorid) eine partielle Kanalblockierung von MppA gemessen werden. Bereits nach einer sauren Zugabe von 0,2 mM Eisenchlorid konnte eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit verzeichnet werden. Die gemessene Leitfähigkeit konnte durch weitere Zugaben von definierten Mengen an Eisenchlorid um bis zu 40 % verringert werden, d.h. die maximale Leitfähigkeit G_{max} von MppA betrug am Ende der Messung nur noch 60 % der Ausgangsleitfähigkeit G_0 . Die Messung zeigte somit, dass eine Bindung von Eisenchlorid an die spezifische Bindestelle von MppA stattgefunden hat.

Da diese erste Messung mit Eisenchlorid bereits erfolgreich eine Bindung des Substrats und somit eine partielle Kanalblockierung von MppA zeigte, wurden weitere Titrationsmessungen im Black Lipid Bilayer mit verschiedenen Aluminium- und Eisensalzen durchgeführt. In diesen Messungen konnte bei saurer Zugabe der Metallsalze (pH kleiner 6) stets ein eingeschränkter Ionenfluss und somit eine konzentrationsabhängige Abnahme der Leitfähigkeit von MppA festgestellt werden. Bemerkenswerterweise zeigte die Zugabe der gleichen Titrationslösungen bei neutralem beziehungsweise alkalischem pH keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit des Kanals. Eine Bindung an die spezifische Bindestelle im Kanal von *M. parvicella* fand somit nur bei saurer Zugabe und nicht bei neutraler oder alkalischer Zugabe von Aluminium- und Eisensalzen statt.

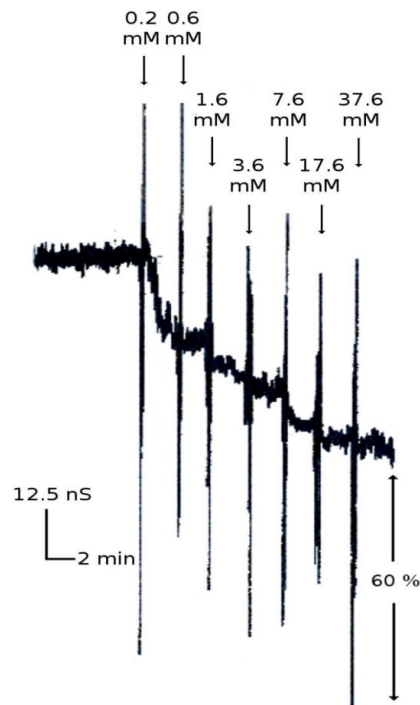


Abbildung 48: Titration mit 0,1 M Eisenchlorid (pH 4,6). Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Die Lösung wurde nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei ab einer Zugabe von mindestens 0,2 mM Eisenchlorid zur Elektrolytlösung detektiert werden. Am Ende der Messung entsprach die gemessene Leitfähigkeit in etwa der 60 % der Ausgangsleitfähigkeit.

In weiteren Messungen wurde der Einfluss der Kationen beziehungsweise Anionen in den Substratlösungen auf die Bindung an MppA untersucht. Dazu wurde das jeweilige Kation beziehungsweise Anion durch alternative Ionen ersetzt.

Bei Titrationsmessungen, bei denen das Kation der Titrationslösung, sprich Aluminium oder Eisen, durch niederwertige Kationen ersetzt wurde, konnte eine verminderte Abnahme der Leitfähigkeit im Vergleich zu dreiwertigen Kationen beobachtet werden. Dreiwertige Kationen zeigten bei Titrationsmessungen stets höhere Bindekonstanten als zweiwertige Kationen. Eine Bindung von einwertigen Kationen an die Bindestelle von MppA konnte nur in sehr geringem Maße festgestellt werden. Der Austausch des Anions (zum Beispiel Chlorid durch Sulfat) führte zu keiner nennenswerten Änderungen der vorher gemessenen Leitfähigkeitsabnahmen (Tabelle 6) und Bindekonstanten (Tabelle 7). Es scheint somit, als werde die Bindung an die Bindestelle hauptsächlich durch die Kationen hervorgerufen und dabei zusätzlich von deren Ionenwertigkeit beeinflusst.

Tabelle 6: Bestimmung der maximalen Leitfähigkeitsabnahme für 4 ausgewählte, saure Eisen- und Aluminiumlösungen. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine Abnahme der Leitfähigkeit konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Untersuchte Lösung	Konzentration [mM]	Maximale Abnahme der Leitfähigkeit [%]
Eisenchlorid pH 4.6	100	45 ± 8.0
Eisensulfat pH 4.6	100	43 ± 2.0
Aluminiumchloridhexahydrat pH 4.6	100	40 ± 1.5
Aluminiumsulfat pH 4.6	100	35 ± 3.0

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich führten alle hier aufgelisteten Lösungen zu einer ähnlich starken Abnahme der Leitfähigkeit von MppA nach deren saurer Zugabe zur Membran. Bei der Abnahme der Leitfähigkeit konnte daher kein Unterschied zwischen der Zugabe von Aluminium im Vergleich zu Eisen festgestellt werden. Auch im Vergleich zu den untersuchten kommerziellen Fäll- und Flockungsmitteln konnte nur eine leicht niedrigere, maximale Abnahme der Leitfähigkeit bestimmt werden.

Tabelle 7: Bestimmung der Bindekonstanten verschiedener Metalllösungen bei Messungen mit MppA. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Die Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Untersuchte Lösung	Konzentration [mM]	Bindekonstante [M^{-1}]
Eisenchlorid pH 4.6	100	320 ± 150
Eisensulfat pH 4.6	100	270 ± 30
Aluminiumchloridhexahydrat pH 4.6	100	285 ± 20
Aluminiumsulfat pH 4.6	100	270 ± 25

Wie man Tabelle 7 entnehmen kann, konnte bei Titrationsmessungen mit den Einzelkomponenten kein Unterschied in den Bindekonstanten von Eisen- und Aluminiumlösungen bei saurer Zugabe festgestellt werden. Alle in der Tabelle aufgelisteten Metalllösungen zeigten mit Werten um $300 M^{-1}$ ähnlich hohe Bindekonstanten wie die vorher untersuchten komplexen Lösungen Steinfloc FT und Südflock K2. Lediglich die untersuchte Lösung Steinfloc PAC 060 zeigte mit rund $700 M^{-1}$ eine höhere Bindekonstante.

Wie zuvor konnte auch bei diesen Titrationsmessungen im neutralen beziehungsweise alkalischen pH-Bereich keine Abnahme der Leitfähigkeit festgestellt werden.

4.8 Einfluss polyvalenter Kationen auf die Ionenselektivität von MppA

Die oben beschriebenen Titrationsexperimente ließen eine Bindung bestimmter Substanzen wie Steinfloc PAC oder divalenter und trivalenter Kationen an MppA bei leicht saurem pH vermuten. Da eine solche Bindung auch die Ionenselektivität von MppA beeinflussen sollte,

wurde diese Möglichkeit durch weitere Selektivitätsmessungen überprüft. Dazu wurde die Selektivität nach Zugabe von geringen Mengen trivalenter Kationen zur wässrigen Phase, d.h. bei vorhandener Bindung von Kationen, erneut gemessen. Diese abgewandelte Selektivitätsmessung wurde bis auf die Zugabe der trivalenten Kationen exakt wie die vorher beschriebene Messung der Selektivität von MppA ohne Bindung von trivalenten Kationen an die Bindestelle durchgeführt.

Interessanterweise wurde nach Etablierung des Salzgradienten durch Zugabe einer 3 M Kaliumchloridlösung die verdünntere Seite der Membran (0,3 M) stets stark negativ mit einem Membranpotenzial von - 11 bis - 12 mV (Tabelle 8). Dieser Effekt wurde anscheinend durch die Bindung der trivalenten Kationen an die negativ geladenen Aminosäurenreste innerhalb von MppA hervorgerufen, wodurch sich die Charakteristik beziehungsweise die Ladung des untersuchten Kanals und somit auch dessen Selektivität änderten.

Durch die Verwendung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Benz et al. 1979) konnte festgestellt werden, dass sich das Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Anionen (P_k/P_a) von 1,2 für die Messung ohne Bindung trivalenter Kationen hin zu 0,4 bei Zugabe von trivalenten Kationen verschoben hat (Tabelle 8). Daher kann man davon ausgehen, dass der Kanal nach Zugabe der Kationen deutlich permeabler für Anionen als für Kationen war und einen Überschuss an positiven Ladungen aufwies.

Tabelle 8: Permeabilitätskoeffizienten von MppA ohne beziehungsweise mit Bindung von trivalenten Kationen im Kanal. Das Membranpotenzial V_m wurde durch Etablierung eines dreifachen Salzgradienten durch Zugabe einer 3 M Kaliumchloridlösung gemessen. Das Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Anionen P_{Kation}/P_{Anion} wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung aus mindestens 3 Messungen ermittelt.

Kanalkonformation	V_m [mV]	Permeabilitätsverhältnis P_{Kation}/P_{Anion}
MppA ohne belegte Bindestelle	2,46	1,2
MppA mit belegter Bindestelle	-11,31	0,4

5 DISKUSSION

5.1 Anzucht der Reinkulturen von *Microthrix parvicella*

Durch die Anzucht von *Microthrix parvicella* in Reinkulturen mit rein synthetischen Medien konnte ausreichend Material für Versuche im Black Lipid Bilayer gewonnen werden. Gutes Wachstum der Reinkulturen konnte insbesondere mit Flüssigmedien beziehungsweise Agarplatten festgestellt werden, welche zusätzlich mit Tween 40 in niedrigen Konzentrationen (0,02 % beziehungsweise 0,04 % Tween 40) angereichert waren. Die Zugabe von Tween 40 war zwingend notwendig, da *M. parvicella* ein im Vergleich zu anderen Bakterien sehr eingeschränktes Spektrum an nutzbaren Kohlenstoffquellen besitzt. So werden durch den Organismus hauptsächlich langkettige Fettsäuren unter anderem in Form von Öl- oder Palmitinsäuren (Andreasen und Nielsen 1997; Andreasen und Nielsen 1998; Nielsen et al. 2002) sowie deren Polyoxyethylensorbitan-Derivate (z.B. Tween 40, Tween 60, Tween 80) verwendet (Slijkhuis 1983). Sonst üblicherweise verwendete Kohlenstoffquellen wie Glucose oder Acetat können hingegen nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden und führen somit bei Reinkulturen von *M. parvicella* nicht zum erforderlichen Wachstum des Organismus.

Tween 40, welches in der vorliegenden Arbeit als Additiv für die Anzucht von *M. parvicella* in Reinkultur verwendet wurde, gehört zu den Polyoxyethylensorbitanderivaten der Palmitinsäure. Dieses kann daher gut von den Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle zum Wachstum und zur Energiegewinnung genutzt werden. Die Zugabe von Tween 40 in das Medium darf jedoch dabei nicht zu hoch sein, da eine zu hohe Konzentration an Tween 40 aufgrund seiner Eigenschaft als Detergenz zu negativen Auswirkungen auf den Organismus führen kann. Übersteigt die Konzentration an Tween 40 im Medium einen kritischen Wert (bei den Flüssigkulturen beispielsweise 1 %), können Membranlipide durch das Detergenz herausgelöst werden. Die Schutzbarriere in Form der Lipidmembran wird somit zerstört und der Organismus stirbt letztendlich ab.

Bei Zugabe von kurzkettigen Fettsäuren konnte nur ein vergleichsweise geringes Wachstum beobachtet werden. Dies hängt damit zusammen, dass *M. parvicella* keine Enzyme zum Aufbau langkettiger Fettsäuren besitzt (Slijkhuis 1983). Stehen hingegen kurzkettige und langkettige Fettsäuren dem Organismus gemeinsam zur Verfügung, sollte ein Wachstum der Reinkulturen zu beobachten sein (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Der genaue Mechanismus der

zeitweisen Nutzung von kurzkettigen Fettsäuren als Kohlenstoffquelle von *M. parvicella* ist dabei aber wie bereits in der Einleitung beschrieben noch nicht vollständig geklärt und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Eine Steigerung der Wachstumsrate konnte bei Zugabe kurzkettiger Fettsäuren parallel zu Tween 40 entgegen der Erwartungen nicht beobachtet werden und wurde daher nicht weiterverfolgt.

Das beste Wachstum von *Microthrix parvicella* konnte nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Medien (modifiziertes, flüssiges LB-Medium und modifizierter R2A-Agar) erreicht werden, sondern mit sogenanntem Belebtschlammhydrolysat aus Kläranlagen, einem „voll-biologischen“ Medium. Aufgrund porenformender Eigenschaften des Mediums konnte dieses jedoch in dieser Arbeit nicht für die Anzucht der Reinkulturen verwendet werden.

Die Verwendung von Belebtschlammhydrolysat als Nährmedium für fädige Organismen geht auf Arbeiten von Eikelboom aus dem Jahre 1975 zurück (Eikelboom 1975). Für die Herstellung des Belebtschlammhydrolysates wird Belebtschlamm aus der Belebung einer Kläranlage zunächst eingedickt und unter Zugabe von Lauge unter Rückflusskühlung gekocht. Nach anschließender Neutralisation mit Säure wird der Schlamm zentrifugiert und der Überstand autoklaviert. Das autoklavierte Belebtschlammhydrolysat wird abschließend verdünnt und mit verschiedenen Vitaminen angereichert. Es handelt sich somit, wie die Herstellung des Belebtschlammhydrolysates erkennen lässt, um ein „voll-biologisches“ Medium, in dem sich unter Umständen immer noch hitze- und säureresistente, beziehungsweise laugenresistente Proteine zurückfalten können. Dies könnte auch im Belebtschlammhydrolysat in dieser Arbeit der Fall gewesen sein. Bilayermessungen mit dem reinen Belebtschlammhydrolysat, welches aus dem Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage der Stadt Würzburg hergestellt wurde, zeigten bereits ohne vorheriges Animpfen mit den Bakterienkulturen eine stark ausgeprägte porenformende Aktivität des Mediums. Das bedeutet, dass das Anzuchtmedium nicht frei von porenformenden Proteinen war. In Bilayermessungen mit Proteinen des Organismus konnte somit nicht ausreichend exakt bestimmt werden, ob es sich bei einem Einbau eines Kanals um Poren von *Microthrix parvicella* oder um „Fremdporen“ aus dem Belebtschlammhydrolysat handelte. Das Belebtschlammhydrolysat war somit aufgrund seiner porenformenden Eigenschaften im Bilayer für die Anzucht der Reinkulturen von *M. parvicella* in dieser Arbeit ungeeignet und musste daher durch ein rein synthetisches Medium in Form von mit Tween 40 angereichertem LB-Medium beziehungsweise R2A-Agar ersetzt werden.

Das beste Wachstum in mit Tween 40 angereicherten LB-Medien konnte in leicht geschüttelten Glasflaschen oder normalen Glaskolben beobachtet werden. Eine Anzucht von *Microthrix parvicella* in Schikanekolben oder starkes Schütteln der Reinkulturen führte hingegen zu einem stark herabgesetzten Wachstum. Dieses Phänomen hängt wahrscheinlich mit der fädigen Struktur des Organismus zusammen. *M. parvicella* bildet 0,5 bis 0,7 µm dicke Fäden aus, die viele hundert µm lang werden können. Aufgrund dieser Länge und der vergleichsweise geringen Dicke können die Fäden leicht brechen, was zu einem Absterben des Fadenfragments führen kann. Dadurch werden zwar Fettsäuren aus der Lipidmembran als Kohlenstoffquelle wieder für die Bakterienkultur verfügbar, jedoch ist die Gesamtwachstumsbilanz gering. Starkes Schütteln oder Hängenbleiben an den für Turbulenzen verantwortlichen Glaseinkerbungen bei Schikanekolben reichen somit bereits aus, um die fädige Struktur von *Microthrix parvicella* brechen zu lassen.

Für die Hypothese des Brechens der Fäden spricht auch die Beobachtung, dass nach dem Einsatz mechanischer Kräfte vermehrt bruchstückhafte Filamente im Medium beobachtet werden konnten und dass das Wachstum sich im Vergleich zu den Referenzkulturen deutlich verringerte. Aufgrund dieser weiteren Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit von *M. parvicella* als Folge des Brechens der Filamente sollte auf mechanische Kräfte, die auf die Fadenstruktur ausgeübt werden könnten, möglichst verzichtet werden.

Der Einfluss mechanischer Kräfte auf die Fadenstruktur von *Microthrix parvicella* lässt sich auch in Kläranlagen beobachtet. Dabei zeigen Anlagen mit Oberflächenbelüftung (z.B. durch Mammutrotoren oder Kreisel) ein geringeres Auftreten von Schwimm- und Blähschlamm als Anlagen mit Druckbelüftung (z.B. durch Platten-, Teller- oder Rohrbelüfter). Versuche auf Kläranlagen, mechanische und physikalische Kräfte für die Bekämpfung von übermäßigem Wachstum von *Microthrix parvicella* zu nutzen, zeigten bereits erste positive Ergebnisse. So konnten durch eine Teilstrombehandlung des Belebtschlammes mit Hilfe eines Desintegrationsverfahrens die Schlammeigenschaften und die Entwässerbarkeit des Schlammes verbessert werden.

5.2 Isolierung der Zellwand von *Microthrix parvicella*

Die Isolation der Zellwand von *Microthrix parvicella* aus den Reinkulturen kann als erfolgreich betrachtet werden. Mit Hilfe eines NADH-Oxidase-Tests (Mizuno und Kageyama 1978) und Untersuchungen der porenformenden Eigenschaften im Black Lipid Bilayer der

verschiedenen Sucrosegradientenfractionen konnten die Cytoplasmamembran und die Zellwand zweifelsfrei in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. Dabei konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass Cytoplasmamembran und Zellwand in unterschiedlichen Fraktionen lokalisiert sind.

Der NADH-Oxidase-Test dient zum Nachweis der inneren Membran. Das Enzym NADH-Oxidase ist an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt und im Komplex I in der inneren Membran lokalisiert. Eine hohe NADH-Oxidase-Aktivität markiert somit die innere Membran, da nur dort das Enzym lokalisiert und aktiv ist. Aufgrund der hohen NADH-Oxidase-Aktivität konnte daher die Cytoplasmamembran der Fraktion 3 im Sucrosegradienten zugeordnet werden.

Die Untersuchungen der porenformenden Eigenschaften der einzelnen Sucrosegradientenfractionen können als Gegenversuch zum NADH-Oxidase-Test angesehen werden. Niedrige Abnahmegeschwindigkeiten beim NADH-Oxidase-Test, d.h. niedrige NADH-Oxidase-Aktivität, gepaart mit hoher Aktivität bei porenformenden Eigenschaften charakterisieren die Fraktion mit der Zellwand. Während in der Zellwand Porine eingebettet sind, fehlen diese in der Cytoplasmamembran komplett, damit das notwendige Membranpotenzial aufrecht erhalten werden kann. Für den Transport über die Cytoplasmamembran sind vielmehr aktive Transportsysteme in Form von beispielsweise Carriern verantwortlich. Fraktion 5, die sich durch niedrige NADH-Oxidase-Aktivität (die Fraktion ist somit frei von Cytoplasmamembran) bei gleichzeitig starken porenformenden Eigenschaften auszeichnete, konnte somit klar der Zellwand zugeordnet werden, während Fraktion 3 keine porenformende Aktivität in Black Lipid Bilayer Messungen zeigte und somit keine Zellwandbestandteile beinhaltet.

Microthrix parvicella gehört zwar zu den Aktinobakterien, besitzt aber keine Mycolsäuren in der Zellwand (Nielsen, 2002, Rossetti et al. 2005). Nielsen und Kollegen konnten aber in ihren Untersuchungen zeigen, dass *Microthrix parvicella* zumindest eine Zellwand mit hydrophoben Eigenschaften besitzt (Nielsen et al. 2002). Dazu nutzen sie die microspheres adhesion to cells Methode (MAC) in Kombination mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Durch das gleichzeitige Auftreten von NADH-Oxidase-Inaktivität und hoher porenformender Aktivität ähnelt die Zellwand *M. parvicella* somit der Zellwand anderer bereits bekannter mycolsäurefreier *Corynebacterium*- (Dörner et al. 2009) und *Streptomyces* Stämme (Kim et al. 2001).

Fraktion 3 mit der Cytoplasmamembran ist im Sucrosegradienten oberhalb der Zellwand-Fraktion (Fraktion 5) lokalisiert. Die Cytoplasmamembran diffundiert dementsprechend

weniger stark in den Sucrosegradienten hinein, sodass angenommen werden kann, dass die Cytoplasmamembran von *Microthrix parvicella* eine geringere Dichte als die Zellwand besitzt.

Bei der Isolation der Zellwand mit Hilfe eines Sucrosegradienten ist zu beachten, dass eine hundert prozentig scharfe Auftrennung der Zellwand und Cytoplasmamembran in einzelne Fraktionen nicht möglich ist. Fraktion 4 des Sucrosegradienten zeigte stets hohe Abnahmegeschwindigkeiten der Adsorption bei gleichzeitig porenformenden Aktivitäten in Rekonstitutionsexperimenten. Dies führt zu der Annahme, dass es in Fraktion 4 zu einer Durchmischung von innerer Membran und Zellwand gekommen ist, d.h. dass keine komplett scharfe Trennung stattgefunden hat. Vielmehr erfolgte bei der Sucrosegradientenzentrifugation eine diffuse Auftrennung, bei der sich dennoch die Cytoplasmamembran und die Zellwand hauptsächlich in zwei Fraktionen befanden. Diese Annahme wurde auch durch die Bestimmung der Proteinmenge der Sucrosegradientenfraktionen mittels SDS-PAGE gestützt. Anzunehmen ist, dass durch die Zentrifugalkräfte während der Zentrifugation einzelne Bestandteile der Zellwand und der Cytoplasmamembran andere Diffusionseigenschaften aufwiesen als die restlichen Zellwand- und Cytoplasmamembranbestandteile. Komponenten mit niedriger Dichte könnten durch andere Stoffe mitgerissen worden und somit tiefer in den Gradienten diffundiert sein als normal. Stoffe mit größerer Dichte könnten hingegen aufgrund sterischer Behinderungen durch andere Bestandteile am Durchdringen der Schichten gehindert worden sein, wodurch diese weniger stark in den Gradienten diffundierten.

5.3 Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine

Wie bereits die Isolierung der Zellwand von *Microthrix parvicella* kann die Isolierung und Aufreinigung der Membranproteine als erfolgreich angesehen werden. Ein Kanalprotein mit dem Namen MppA, welches porenformende Eigenschaften im Bilayer und ein Molekulargewicht von 60 kDa aufweist, konnte aus der hydrophoben Zellwand von *Microthrix parvicella* isoliert und aufgereinigt werden.

Mehrfachwaschungen mit verschiedenen Detergenzien (LDAO, Genapol, Triton) zeigten bereits, dass es möglich war, Membranproteine mit Hilfe von Detergenzien aus der lipidhaltigen Membran von *M. parvicella* herauszulösen. Erklären lässt sich die

Notwendigkeit dieser Detergenzienbehandlung durch die Eigenschaften von integralen Membranproteinen in wässrigen Lösungen.

Integrale Membranproteine sind in wässrigen Lösungen aufgrund ihrer Hydrophobizität, d.h. aufgrund ihrer wasserabweisenden Eigenschaften, eher als gering löslich anzusehen. Detergenzien wie LDAO, Genapol oder Triton sind daher in gewissen Konzentrationen zur Solubilisierung der Membranproteine in wässrigen Medien essenziell. Die Detergenzien bilden Micellen um die Lipide aus und ahmen somit für die Lipide eine lipidähnliche Umgebung in der wässrigen Lösung nach. Dadurch werden die integralen Membranproteine in die durch die Lipide entstandenen Micellen inkorporiert, wodurch die Proteine letztendlich wie gewünscht gelöst in Lösung vorliegen.

Die verschiedenen in dieser Arbeit getesteten Detergenzien unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre spezifische, kritische Micellenbildungskonzentration. Diese Micellenbildungskonzentration beschreibt die jeweils geringste Konzentration an Detergenz, bei der in der wässrigen Lösung noch Micellen gebildet werden können.

Proteine können zwar durch Detergenzien aus der Membran herausgelöst werden, ein spezifisches Herauslösen einzelner Proteine wie beispielsweise MppA kann jedoch nicht erreicht werden. Vielmehr werden alle Proteine, die aus der Membran theoretisch durch die Detergenzien lösbar sind, in Abhängigkeit ihrer Detergenzlöslichkeit solubilisiert. Dies wird durch die große Proteinvarietät auf dem Polyacrylamidgel in Abbildung 35 deutlich. Mit Hilfe von 1 % LDAO konnte neben MppA eine Vielzahl von Proteinen aus der Membran gelöst werden, die teilweise ebenfalls porenformende Eigenschaften bei Messungen mit künstlichen Lipidmembranen zeigten. Daher reicht eine Detergenzienwaschung zur exakten Aufreinigung eines einzelnen Proteintyps wie MppA nicht aus. Vielmehr müssen weitere Aufreinigungsschritte durchlaufen werden, um gezielt einzelne Proteine aus der kompletten Proteinmasse heraus zu isolieren. Dies erfolgte mit Hilfe zweier aufeinanderfolgender FPLC-Läufe mit unterschiedlichen Säulen (Anionenaustauschersäule gefolgt von einer Gelfiltrationssäule).

Der Verlauf des ersten Fast Protein Liquid Chromatographie-Laufes mit angeschlossener Anionenaustauschersäule zeigte ein zeitlich versetztes Abwaschen der an die Säule gebundenen Proteine und somit eine gute Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit von der jeweiligen Ladung. Die in der Lösung befindlichen Proteine wurden dabei unterschiedlich stark an die bepackte MonoQ-Säule gebunden, wodurch stärker geladene Proteine aufgrund des angelegten Salzgradienten deutlich später von der Anionenaustauschersäule gewaschen wurden als ungeladene beziehungsweise schwächer geladene Proteine. Durch Einstellen der

Steilheit des Salzgradienten, d.h. durch unterschiedlich schnelle Steigerung des Hochsalzpufferanteils in der Säule, konnten auch ähnlich stark geladene Proteine zeitlich versetzt von der Säule eluiert und durch Auffangen einzelner Fraktionen erfolgreich voneinander separiert werden.

Betrachtet man den ersten FPLC-Lauf mit angehängter Anionenaustauschersäule in Abbildung 36 genauer, so fallen mehrere Proteinpeaks in der blauen Kurve auf. Jeder Peak entspricht dabei einer aufgefangenen Fraktion, in der Proteine enthalten sind. Die Detektierung dieser Proteine in den aufgefangenen Fraktionen wird dabei durch eine Änderung der Adsorptionsintensitäten im UV-Detektor sichtbar gemacht.

Das Zustandekommen der verschiedenen Proteinpeaks im Laufe des Versuchs lässt sich gut anhand des angelegten Salzgradienten erklären. Der erste Proteinpeak gleich zu Beginn des FPLC-Laufes (bei Fraktion 3) kommt durch Proteine zustande, die nicht an die Anionenaustauschersäule binden. Zu diesem Zeitpunkt liegt noch kein Salzgradient an der Säule an (dargestellt als schwarze beziehungsweise rote Kurve), welcher ein Abwaschen der gebundenen Proteine von der Säule verursachen würde. Die Fraktion kann daher als Durchfluss betrachtet werden und beispielsweise in weiteren Versuchen auf alternative FPLC-Säulen aufgetragen werden.

Hohe Mengen an Proteinen im Durchfluss werden üblicherweise gemessen, wenn die Proteine aufgrund nicht vorhandener Ladungen keine Bindung an die Anionenaustauschersäule zeigen oder die aufzutragende, maximale Proteinkonzentration der Säule überschritten wird. In diesem Fall werden die aufgetragenen Proteine einfach durch die Säule hindurch transportiert und folgen dabei nur der Geschwindigkeit des Puffers. Eine Auftrennung der Proteine nach deren Ladung ist daher zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

Die auf den Durchfluss folgenden Proteinpeaks des FPLC-Laufs werden durch eine unterschiedlich starke Bindung der gelösten Proteine an die MonoQ-Säule hervorgerufen. Die Bindung der Proteine an die Säule erfolgt über den Austausch von Ionen aus der Lösung mit Ionen der Säulenmatrix, d.h. das stärker bindende Ion aus der Lösung verdrängt das an die Säulenmatrix gebundene, aber im Vergleich schwächer bindende Ion von der Bindestelle der Säule. Die Bindung an die Säule ist dabei umso stärker, je höher die Ladung und je kleiner der Ionenradius ist. Durch Anlegen des Salzgradienten werden die an der Säule gebundenen Ionen wieder durch stärker bindende Ionen in der Salzlösung von den Bindestellen der Säulenmatrix verdrängt.

Zu Beginn des Salzgradienten, d.h. bei niedrigen Salzkonzentrationen, werden zunächst die schwach an der Säulenmatrix bindenden Ionen durch die Ionen des Elutionspuffers ersetzt

und abgewaschen. Mit voranschreitendem Salzgradient und somit steigenden Salzkonzentrationen im Laufpuffer werden immer mehr Ionen der Probe durch die Ionen der Lösung von der Säule verdrängt und abgewaschen. Dies bedeutet, dass bei höheren Salzkonzentrationen abgewaschene Proteine eine stärkere Bindung an die Säule aufweisen als Proteine, die bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen eluiert wurden. Durch diese unterschiedlichen starken Bindungskräfte kann eine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Ladung und somit ihrer Bindung an der Säule durch Variation des Salzgradienten erfolgen, wodurch die Proteine erfolgreich voneinander separiert werden können.

Durch Anlegen der maximalen Salzkonzentration von 1 M Natriumchlorid (ab Fraktion 52) werden auch die letzten, stark gebundenen Proteine von der Anionenaustauschersäule abgewaschen. In diesen letzten Fraktionen kann jedoch wie bereits in der Durchflussfraktion keine Auftrennung anhand der Ladung erfolgen. Vielmehr werden alle noch an die Säulenmatrix gebundenen Proteine abgewaschen und in einer Fraktion gemeinsam gesammelt. Jedoch können diese Fraktionen ähnlich wie die Durchflussfraktionen in anderen Läufen mit anderen Säulen weiter untersucht werden.

Mit Hilfe der hier beschriebenen Anionenaustauschersäule konnten besonders durch Variation des angelegten Salzgradienten in Form von unterschiedlich stark steigenden Natriumchloridkonzentrationen im Laufpuffer die Proteine gemäß ihrer unterschiedlichen Ladungen voneinander separiert werden. Die Ladung der Proteine zeigte dabei jedoch keinen Zusammenhang zum jeweiligen Molekulargewicht. Eine einzige Fraktion mit ähnlich stark bindenden Proteinen beinhaltet daher eine große Vielfalt an Proteinen unterschiedlichster Molekulargewichte. Eine Auftrennung anhand der Ladung ist somit noch nicht ausreichend für eine vollständige Isolation und Aufreinigung von MppA.

Die vergleichsweise hohe Anzahl der Proteinpeaks in der blauen Kurve in Abbildung 36 weist auf die vor dem FPLC-Lauf mit angehängter MonoQ-Säule vorhandene große Varietät der Proteine in der Lösung hin. Dies bestätigt erneut die Ergebnisse der vorangegangenen Gel-Chromatographie (SDS-PAGE) der verschiedenen Fraktionen der Detergenzienwaschung. Bereits bei dieser chromatographischen Auftrennung konnte eine hohe Anzahl unterschiedlichster Proteine nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Proteingehalte in den einzelnen FPLC-Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass eine ladungsabhängige Auftrennung durch die MonoQ-Säule zwar stattgefunden hat (siehe Abbildung 37), diese aber für weitere Messungen in Einzelkanalexperimenten im Black Lipid Bilayer nicht ausreichend war. Die Varietät der Proteine nahm in den gesammelten FPLC-Fraktionen zwar im Vergleich zur Ausgangslösung der

Detergenzienwaschung ab, dennoch war eine vollständige Separation einzelner Proteine nicht möglich.

Die Überprüfung der porenformende Aktivität aller getesteten FPLC-Fractionen, insbesondere von Fraktion Nummer 16, zeigte, dass porenformende Proteine noch funktionell in Lösungen vorhanden waren und die porenformende Aktivität der Proteine durch den Aufreinigungsschritt mit der Fast Protein Liquid Chromatography nicht beeinträchtigt wurde. In Fraktion 16 des FPLC-Laufes konnten verschiedene Leitfähigkeiten gemessen werden, was darauf hindeutete, dass in der Proteinlösung mindestens ein porenformendes Protein lokalisiert war. Dies machte eine weitere Aufreinigung mit geeigneten Methoden wie beispielsweise einer nachfolgenden FPLC notwendig.

In diesem zweiten FPLC-Schritt wurde anstelle einer Anionenaustauschersäule (MonoQ) eine Gelfiltrationssäule (Superdex) zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht an die FPLC-Apparatur angeschlossen. Mit Hilfe dieser Gelfiltrationssäule konnten die Proteine der Fraktion 16 erfolgreich entsprechend ihrer Größe voneinander separiert werden. Betrachtet man beide Läufe zusammen, so wurden die Proteine erst nach ihrer Ladung und anschließend nach ihrer Größe separiert.

Bei einer Superdex-Gelfiltrationssäule kommt es nicht wie bei einer MonoQ-Säule zu einer ladungsabhängigen Bindung der Proteine an der Matrix der Säule. Die Proteine wandern vielmehr aufgrund ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die eng gepackte Säulenmatrix hindurch und können in unterschiedlichen Fraktionen gesammelt werden. Kleine Proteine wandern dabei langsamer durch die Säule hindurch als größere Proteine und werden daher auch erst in späteren Fraktionen aufgefangen als die größeren Proteine.

Im Gegensatz zur Anionenaustauschersäule kann bei Verwendung einer Gelfiltrationssäule ein Auftreten von Durchflussfraktionen oder gemischten Hochsalzfraktionen nicht festgestellt werden, da bei der Nutzung einer Gelfiltrationssäule ein Anlegen eines Salzgradienten nicht notwendig ist. Dennoch muss eine zu große Beladung der Gelfiltrationssäule vermieden werden, da es sonst unter Umständen zu einer sterischen Behinderung beziehungsweise zu einem gegenseitigen Mitreißen der Proteine bei der Durchwanderung der Säule kommen könnte. In diesem Fall können die Proteine nicht mehr ausreichend gemäß ihrer Größe in die unterschiedlichen Fraktionen aufgetrennt werden.

Die Gelfiltration ist mit einer Gelelektion vergleichbar, jedoch wesentlich schonender für die Proteine. Bei einer Gelelektion durchwandern die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes unterschiedlich schnell die Polyacrylamidschichten des Gels und werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend werden die Proteinbanden aus dem Gel

vorsichtig herausgeschnitten und mit Hilfe von Detergenzienlösungen wie 1 % LDAO aus der Polyacrylamidmatrix herausgelöst. Die Gelfiltration arbeitet prinzipiell nach der gleichen Methode, ist aber aufgrund des Fehlens von Natriumdodecylsulfat (SDS) und des elektrischen Feldes bedeutend sanfter für die Proteine als eine Gelelution. In den Polyacrylamidgelen enthaltenes SDS kann die Struktur der zu untersuchenden Proteine zerstören, wodurch eventuell die porenformenden Eigenschaften der Proteine im Black Lipid Bilayer beeinträchtigt werden könnten. Auch könnten Beeinträchtigungen der Proteinfunktionalitäten durch das elektrische Feld während der chromatographischen Auftrennung entstehen, da im elektrischen Feld Temperaturen auftreten können, die wie das SDS die Porenformation durch Veränderung der Proteinstruktur behindern beziehungsweise verändern könnten.

Bei den isolierten und untersuchten Porinen aus *Microthrix parvicella* konnte eine mittlere SDS- und Temperatursensitivität der Proteine festgestellt werden, so dass zwar nach einer Gelelution ein Kanaleinbau in den Lipidmembranen zu beobachten war, jedoch in einer schwächeren Intensität und mit einer veränderten Häufigkeit der Leitfähigkeiten im Vergleich zur Aufreinigung mit einer Gelfiltrationssäule. Daher sollte eine Gelfiltration bei der Isolierung der Porine aus *Microthrix parvicella* stets einer Gelelution mittels SDS-PAGE vorgezogen werden.

Neben einer höheren Porenaktivität und Signalqualität konnte bei der Gelfiltration auch eine deutlich höhere Proteinausbeute festgestellt werden. Dies hängt anscheinend damit zusammen, dass bei der Gelfiltrationssäule alle Proteine komplett die Matrix durchwandern ohne dabei zurückgehalten zu werden. Bei der Gelelution hingegen sind die Proteine stärker in die Polyacrylamidmatrix eingebettet und daher schlechter durch Detergenzien solubilisierbar. Es wäre daher denkbar, dass ein nicht zu unterschätzender Proteinanteil im SDS-Gel zurückbleibt und somit für weitere Messungen im Gegensatz zur Gelfiltration nicht zur Verfügung steht.

Wie bereits beschrieben, durchwandern bei der Gelfiltration mit Hilfe der Superdex-Säule die Proteine unterschiedlich schnell die Matrix der Gelfiltrationssäule. Leichtere Proteine befinden sich in den vorderen Fraktionen des FPLC-Laufes, schwerere Proteine haben hingegen eine höhere Verweilzeit in der Säule und werden daher erst in den hinteren Fraktionen gesammelt. Insgesamt konnten, wie in Abbildung 38 ersichtlich, 4 verschiedene Fraktionen gesammelt werden, welche Proteine enthielten. Das gewünschte Protein MppA mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, welches in künstlichen Lipidmembranen Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 600 pS bei 1 M Kaliumchlorid formte, konnte dabei in Fraktion 15 detektiert werden.

Unter gewissen Umständen konnte bei einer SDS-PAGE mit Fraktion 15 eine zweite Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 52 kDa festgestellt werden. Da diese aber nicht bei jeder Aufreinigung vorhanden war und auch keine Verunreinigung bei Bilayermessungen darstellte (eventuell andere Leitfähigkeiten in Form von Fremdporinen), kann das Porin als komplett aufgereinigt angesehen werden.

Die Identifizierung von MppA lässt sich gut mit den Untersuchungen von Nielsen et al. vereinbaren, bei denen hydrophobe Eigenschaften der Zelloberfläche von *M. parvicella* nachgewiesen werden konnten (Nielsen et al. 2002). Um hydrophilen Stoffen den Durchlass durch diese hydrophobe Barriere zu ermöglichen, sind wassergefüllte Kanäle in der Zellwand zwingend notwendig. Die Isolierung von MppA beweist somit die Existenz von mindestens einer Kanalspezies in der Zellwand von *M. parvicella* und ist daher ein weiteres Indiz für den hydrophoben Charakter der Zelloberfläche von *M. parvicella*.

5.4 Einzelkanalmessungen eines Porins aus *Microthrix parvicella*

Die Einzelkanalmessungen des Porins MppA aus *Microthrix parvicella* zeigten im Black Lipid Bilayer einen wassergefüllten Kanal mit einer Leitfähigkeit von 600 pS in einer 1 M Kaliumchloridlösung. Zu Beginn der Messung konnte eine zweite, seltener auftretende Leitfähigkeit von 300 pS in 1 M Kaliumchlorid detektiert werden. Bei der Überprüfung eines möglichen gerichteten Einbaus von MppA in die Membran konnte kein Unterschied festgestellt werden, ob das Porin auf der *cis*- oder der *trans*-Seite zu der künstlichen Lipidmembran gegeben wurde. Dies lässt vermuten, dass kein starr gerichteter Einbau der Kanäle in die Membran erfolgt.

Das Auftreten einer seltenen, zweiten Leitfähigkeit nur zu Beginn einer Messung ist bereits bei verschiedenen Kanälen grampositiver Bakterien beobachtet worden (Lichtinger et al. 2001; Barth et al. 2010). Betrachtet man die beiden gemessenen Leitfähigkeiten von MppA genauer, so fällt auf, dass sich beide Leitfähigkeiten um den Faktor 2 unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass MppA zwei Konformationen besitzen könnte – eine hauptsächlich auftretende Konformation mit einer Leitfähigkeit von 600 pS und eine seltener auftretende Konformation mit einer Leitfähigkeit von 300 pS.

Bei der Leitfähigkeit von 300 pS könnte es sich neben verschiedener Konformationen auch um den Teileinbau eines Kanals (z.B. eines Monomers) beziehungsweise bei der Leitfähigkeit von 600 pS um den kompletten Einbau eines Kanals (z.B. in Form eines Dimers) in die

künstliche Lipidmembran handeln, wodurch die beiden Leitfähigkeiten zwei Zustände eines MppA-Oligomers repräsentieren würden.

Für die Theorie eines MppA-Oligomers spricht die Tatsache, dass nur bei frischer Zugabe des aufgereinigten Proteins zur schwarzen Lipidmembran und nur zu Beginn der jeweiligen Einzelkanalmessung Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 300 pS messbar waren. Mit voranschreitender Messdauer bauten fast nur noch Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 600 pS in die Lipidmembran ein. Es könnte daher sein, dass sich die Proteine in der Elektrolytlösung erst in die richtige Konformation falten müssen. Ist diese korrekte Faltung dann nach kurzer Zeit erfolgt, bauen ausschließlich die größeren Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 600 pS in die Membran ein.

Die Notwendigkeit der korrekten Faltung von MppA zur Formation der 600 pS-Kanäle konnte auch bei Versuchen mit vorher eingefrorenen Proteinproben beobachtet werden. Messungen mit vorher eingefrorenen Proben zeigten zwar ebenfalls die gleichen Leitfähigkeiten wie bei Messungen mit frisch aufgereinigten Proben, in den Histogrammen war aber eine deutliche Verschiebung in der Häufigkeitsverteilung der Leitfähigkeiten erkennbar. Das Verhältnis von 300 pS- Kanälen zu 600 pS-Kanälen hatte sich bei den vorher gefrorenen Proben zu Gunsten der kleineren 300 pS-Kanäle verschoben. Auch dauerte es bei der Messung mit den vorher gefrorenen Proben deutlich länger, bis sich ausschließlich 600 pS-Kanäle in der Lipidmembran rekonstituierten.

Das gleiche Phänomen konnte auch bei einer Gelelution beobachtet werden. Wurde für eine Bilayermessung MppA verwendet, welches zuvor nur über eine Gelelution aufgereinigt worden ist, so konnte ein verstärktes Auftreten der kleineren 300 pS-Kanäle festgestellt werden. Dies beweist, dass ein Einfrieren der Proben oder eine Gelelution, d.h. ein Kontakt mit SDS, zwar möglich ist, die porenformenden Eigenschaften von MppA jedoch dadurch beeinflusst werden. Daher sollte bei den Messungen im Black Lipid Bilayer stets darauf geachtet werden, dass MppA möglichst frisch durch eine Gelfiltration aufgereinigt und zeitnah verwendet wird.

Eine vergleichsweise niedrige Leitfähigkeit von 600 pS wie bei MppA ist typisch für wassergefüllte Kanäle, die eine Bindestelle für spezifische Substrate besitzen (z.B. das zuckerspezifische LamB (Benz et al. 1987) oder das nucleosidspezifische Porin Tsx (Maier et al. 1988)). Die niedrige Leitfähigkeit von 600 pS kann bereits als erster Hinweis darauf gesehen werden, dass eventuell spezifische Bindestellen im Kanal von *Microthrix parvicella* vorhanden sind, welche durch Titrationsexperimente mit verschiedenen Substraten detektiert werden könnten.

Während der Einbau von allgemeinen Diffusionsporen in die Membran eher durch Kanäle mit höheren Leitfähigkeiten charakterisiert ist, zeichnen sich Kanäle mit spezifischen Bindestellen durch üblicherweise niedrigere Leitfähigkeiten aus. Die Unterschiede in den Leitfähigkeiten hängen mit der jeweils gewünschten Funktion des eingebauten Kanals zusammen. Die Diffusionsporen sollen generell den Durchlass von Stoffen und Molekülen durch die Lipidmembran gewährleisten. Sie arbeiten dabei wenig selektiv und besitzen als Hauptausschlussmerkmal von Molekülen mehr oder weniger nur die Größe der Kanalengstelle. Kleinere Stoffe gelangen ungehindert durch den Kanal, während größere Stoffe aufgrund der Kanalengstelle den Kanal nicht passieren können und somit nicht durch die hydrophobe Membran hindurch in die Zelle gelangen können. Da eine Diffusionspore bei Stoffen, welche den Kanal durchqueren können, nur eine größenabhängige Selektion erlaubt, ist eine konzentrationsabhängige Diffusion der Stoffe durch den Kanal zu beobachten. Je höher die vorhandene Stoffkonzentration im umgebenden Medium ist, desto größer ist auch die Diffusion des Stoffes (Flussrate) durch den Kanal und somit in die Zelle hinein (Abbildung 28). Daher sind diese Poren vor allem für den unspezifischen Transport von Stoffen durch die Zellwand verantwortlich, d.h. für Stoffe, die üblicherweise in großen Mengen im Medium verfügbar sind.

Spezifische Kanäle mit Bindestellen wie beispielsweise LamB oder Tsx zeigen eine deutlich höhere Selektivität gegenüber den Stoffen im Medium als Diffusionsporen. Besonders die Bindestellen im Kanal mit ihren jeweils charakteristischen Ladungsverhältnissen führen dazu, dass gezielt an die Bindestelle aggregierende Substanzen in hohen Raten durch den Kanal transportiert werden können (Abbildung 28). Dies hat neben der Selektierung eine effektive Aufnahme von Stoffen zur Folge, welche nur in niedrigen Konzentrationen im Medium vorhanden sind. Daher können solche spezifischen Poren mit Bindestellen insbesondere für solche Stoffe gefunden werden, die nur in geringen Konzentrationen im umliegenden Medium zur Verfügung stehen, jedoch essenziell für das Wachstum beziehungsweise den Erhalt der Organismen sind. Im Falle von MppA konnte beispielsweise in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass der Kanal unter anderem für den spezifischen und daher effektiven Transport von Eisen verantwortlich ist. Eisen ist als Spurenelement essenziell für *Microthrix parvicella*, aber üblicherweise nur in geringen Mengen im Medium – sprich im Abwasser – für den Organismus verfügbar. Daher würde eine eisenspezifische Bindestelle von MppA hohe Aufnahmeraten von Eisen auch bei niedrigen Konzentrationen im Medium gewährleisten.

Bei weiteren Messungen im Black Lipid Bilayer wurde die Einzelkanalleitfähigkeit von MppA als Funktion unterschiedlicher Kaliumchloridkonzentrationen und unterschiedlicher Elektrolytsorten untersucht. Bei Einzelkanalmessungen mit unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Einzelkanalleitfähigkeit von MppA in etwa einer linearen Funktion der Elektrolytkonzentration entspricht. Bei steigenden Elektrolytkonzentrationen konnte dementsprechend eine ebenso stark steigende Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Ergebnisse waren ein Indiz dafür, dass MppA keine Bindestelle für K^+ - und Cl^- -Ionen besitzt.

Eine lineare Abhängigkeit zwischen Elektrolytkonzentration und Leitfähigkeit ist eigentlich typisch für Diffusionsporen, d.h. für Poren ohne Bindestellen. Wie spätere Titrationsexperimente mit dem Kanal zeigten, konnte aber eine Bindung von Stoffen an MppA für höherwertige Kationen nachgewiesen werden. MppA besitzt somit anscheinend nur eine Bindestelle für mehrwertige Kationen, wodurch für die einwertigen Cl^- -Ionen und K^+ -Ionen keine Bindung festgestellt werden konnte. Da somit bei reinem Kaliumchlorid als Elektrolyt keine Bindung in Einzelkanalmessungen auftrat, konnte eine Linearität zwischen Elektrolytkonzentration und Leitfähigkeit trotz vorhandener Bindestelle im Kanal beobachtet werden.

Interessanterweise war es nicht möglich, Einzelkanaleinbauten in hoher Anzahl bei einer Kaliumchloridkonzentration von unter 0,3 M nachzuweisen. Daher wurde auch für weitere Messungen die Kaliumchloridkonzentration auf maximal 0,3 M abgesenkt. Die geringe Kanaleinbauhäufigkeit von MppA bei niedrigen Elektrolytkonzentrationen wurde wahrscheinlich durch eine hohe Ladungsdichte an der Oberfläche von MppA hervorgerufen, welche zu einer Blockierung der Rekonstitutionsprozesse bei niedrigen Ionenstärken tendierte und somit eine Messung der Einzelkanalleitfähigkeit erschwerte.

Die Messung der Einzelkanalleitfähigkeiten in unterschiedlichen Elektrolytlösungen (Kaliumchlorid, Lithiumchlorid und Kaliumacetat) zeigte eine minimale Selektivität des aufgereinigten Kanals MppA aus *Microthrix parvicella* für Kationen. Im Vergleich zur Messung mit Kaliumchlorid führte der Austausch des Kaliumions gegen das weniger mobile Lithiumion zu einer minimal stärkeren Abnahme der Leitfähigkeit wie der Austausch des Chloridions gegen das weniger mobile Acetat.

Die jeweilige Abnahme der Leitfähigkeit bei Austausch der Ionen gegen weniger mobile Ionen lässt sich durch die größere Hydrathülle des Lithium- und Acetations im Vergleich zum Kalium- beziehungsweise Chloridion erklären. Durch die unterschiedlich großen Hydrathüllen kommt es zu einer generell verringerten Beweglichkeit der Ionen und somit zu

einem erschwerten Wandern der Ionen durch den Kanal. Da die Abnahme der Leitfähigkeit bei einem Austausch des Kations nur leicht stärker als bei einem Austausch des Anions war, kann zwar von einer minimalen Kationenselektivität gesprochen werden, aber es können nur wenige Rückschlüsse auf die vorhandenen Ladungsverteilungen im Kanal MppA gezogen werden. Eine leichte Kationenselektivität von MppA, wie in den Einzelkanalmessungen im Black Lipid Bilayer detektiert, würde aber für einen geringen Gesamtüberschuss an negativen Ladungen im Kanal sprechen.

Weitere Messungen von MppA in Form von Ionenselektivitätsmessungen erlaubten schließlich (siehe nachfolgender Abschnitt 5.5), differenziertere Aussagen über die Ladungsverhältnisse innerhalb des Kanals zu treffen. Dennoch gab der Austausch des Elektrolyts bei der Messung der Einzelkanalleitfähigkeit im Black Lipid Bilayer bereits erste Hinweise für die Auswahl der zu titrierenden Substanzen in nachfolgenden Bindungsexperimenten.

5.5 Selektivität von MppA

Die Ergebnisse der Selektivitätsmessungen von MppA bestätigten die vorherigen Ergebnisse der Einzelkanalmessungen in unterschiedlichen Elektrolyten. Bei freier Bindestelle von MppA konnte eine leichte Kationenselektivität als Indiz für einen minimalen Überschuss negativ geladener Aminosäuren im Kanal festgestellt werden. Bei einer besetzten Bindestelle von MppA, d.h. nach einer vorangegangenen Bindung von mehrwertigen Kationen im Kanal, drehte sich aber interessanterweise die vorher leichte Kationenselektivität hin zu einer starken Anionenselektivität.

Bei einer Messung in Kaliumchlorid ohne vorherige Bindung von mehrwertigen Kationen an die Bindestelle von MppA betrug das mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung bestimmte Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Anionen (P_k/P_a) 1,2, was bedeutet, dass MppA im Normalfall für Kationen leicht permeabler ist als für Anionen. Das gemessene Membranpotenzial betrug dabei ca. +2,46 mV. Das Permeabilitätsverhältnis von 1,2 und das geringe Membranpotenzial führten letztlich zu der Annahme, dass die Ladungsverhältnisse im untersuchten Kanal relativ neutral sind und nur ein geringer Überschuss an negativ geladenen Aminosäuren im Kanal vorhanden ist. Rückschlüsse auf die Verteilung der jeweiligen Ladungen innerhalb des Kanals konnten jedoch durch diese Ergebnisse allein noch nicht gezogen werden.

Weitaus differenziertere Rückschlüsse über die Verteilung der positiven und negativen Ladungen im Kanal von *Microthrix parvicella* konnten erst durch die Kombination mit den Selektivitätsmessungen nach Zugabe von mehrwertigen Kationen, welche die spezifische Bindestelle von MppA besetzten, gezogen werden. Die Bindung dieser mehrwertigen Kationen an die Bindestelle im Kanal führte zu einem Wechsel der Selektivität des Kanals von einer leichten Kationenselektivität ohne Bindung hin zu einer starken Anionenselektivität mit Bindung. Die Permeabilitätsverhältnisse von Kationen zu Anionen (P_K/P_a) änderten sich dabei von 1,2 ohne Bindung zu 0,4 mit Bindung, was bedeutet, dass der Kanal bei besetzter Bindestelle deutlich permeabler für Anionen als für Kationen war. Das Membranpotenzial drehte ebenfalls von leicht positiven Werten (+2,46 mV) ohne Bindung hin zu stark negativen Werten (-11,31 mV) nach erfolgter Bindung von mehrwertigen Kationen an die Bindestelle von MppA. Das Permeabilitätsverhältnis von 0,4 und das vergleichsweise hohe Membranpotenzial waren letztlich ein Indiz dafür, dass im untersuchten Kanal nach Bindung ein nicht unerheblicher Überschuss an positiven Ladungen vorhanden sein muss.

Die starke Änderung der Permeabilitätskoeffizienten lässt darauf schließen, dass es bei einer Bindung von mehrwertigen Kationen an die spezifische Bindestelle von MppA zu einer Verschiebung der Ladungsverhältnisse im Kanal kommt. Da nach der Bindung von dreiwertigen Kationen an die Bindestelle eine sehr starke Anionenselektivität gemessen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass sich im Bereich der Bindestelle relativ geballt mehrere negative Ladungen befinden, die man sich als eine negative Ladungswolke vorstellen könnte. Eine oder mehrere positive Ladungswolken als Gegenpol zur negativ geladenen Wolke an der Bindestelle könnten sich an den Kanaleingängen befinden, wobei die positiven Ladungswolken zusammen ähnlich stark geladen sein müssten wie die negative Ladungswolke an der Bindestelle. Im Falle einer Bindung von mehrwertigen Kationen an die Bindestelle von MppA würden die negativen Aminosäurenreste in diesem Bereich von den Kationen abgeschirmt werden, sodass der Kanal nach erfolgter Bindung insgesamt einen Überschuss an positiv geladenen Aminosäuren aufweisen würde und stark anionenselektiv wäre.

5.6 Spannungsabhängigkeit von MppA

Bei der Messung möglicher Spannungsabhängigkeiten des Porins MppA aus *Microthrix parvicella* konnte ein spannungsabhängiges Schließen des Kanals bereits bei sehr niedrigen

Spannungen beobachtet werden. Eine angelegte Spannung von + 20 mV beziehungsweise von – 20 mV führte bereits zu einem partiellem Schließen des Kanals. Das Schließen des Kanals MppA bei angelegten Spannungen weist auf mehrere geladene Aminosäuren innerhalb des Kanals hin, was somit ein weiterer Beleg für deren Existenz wäre. Die geladenen Aminosäuren im Kanal könnten mit der extern angelegten Spannung wechselwirken, wodurch ein spannungsabhängiges Schließen des Kanals auftreten würde.

5.7 Bindungsmessungen mit Hilfe der Titrationsmethode

Die Ergebnisse der Bindungsmessungen mit verschiedenen kommerziellen Fäll- und Flockungsmitteln sowie deren Einzelkomponenten zeigen klar und deutlich eine spezifische Bindestelle für mehrwertige Kationen in den Kanälen, welche durch das aufgereinigte Protein MppA aus *Microthrix parvicella* in Lipidmembranen inseriert wurden.

Alle in dieser Arbeit untersuchten handelsüblichen Fäll- und Flockungsmittel werden zur Bekämpfung von durch fädige Organismen verursachten Schwimm- und Blähschlammproblemen auf Kläranlagen eingesetzt. Die Fäll- und Flockungslösungen beinhalteten dabei Komponenten, die im Kanal MppA von *M. parvicella* gebunden wurden und somit durch die partielle Blockierung des Kanals zu einer Abnahme der gemessenen Leitfähigkeit führten. Dies beweist, dass die Bekämpfung von *Microthrix parvicella* nicht alleine auf einem Adsorptionsprozess der Substanzen aus den Fäll- und Flockungsmitteln an der Oberfläche der fädigen Organismen beruht. Vielmehr werden diese Stoffe gezielt an der spezifischen Bindestelle im Kanal gebunden und gelangen somit eventuell durch den Kanal in den periplasmatischen Raum des Organismus beziehungsweise führen durch deren Bindung im Kanal zu dessen partieller Blockierung.

Die in dieser Arbeit untersuchten kommerziellen Fäll- und Flockungsmitteln bestehen hauptsächlich aus verschiedenen konzentrierten Metallsalzen. Bei dem Produkt Steinfloc PAC 060 handelt es sich um eine Lösung der Firma Steinebach Chemikalien (Lüdenscheid), die vorwiegend Polyaluminiumhydroxidchlorid mit einem Anteil von 6 % Aluminium beinhaltet. Steinfloc FT hingegen, ebenfalls von der Firma Steinebach Chemikalien (Lüdenscheid) vertrieben, beinhaltet eine Mischung aus Salzen der Metalle Aluminium und Eisen. Neben Aluminiumsulfat mit einem Aluminiumanteil von 3,3 % ist Eisen(III)chlorid mit einem Anteil von 1,5 % Eisen als weiterer Bestandteil der Lösung vertreten. Das dritte untersuchte kommerzielle Produkt ist unter dem Namen Südflock K2 erhältlich und gehört zur

Produktgruppe der Firma Clariant (München, ehemals Südchemie). Südflock K2 ist eine Mischung aus Aluminiumchlorid (der Aluminiumanteil der Lösung beträgt 9,5 %) und Eisen(III)chlorid (Eisenanteil 3 %).

Allen hier untersuchten Fäll- und Flockungsmitteln gemein ist ein stark saurer pH-Wert von kleiner 1. Weiterhin weisen alle Lösungen aufgrund des Herstellungsprozesses unterschiedlich starke Verunreinigungen durch Schwermetalle wie Blei, Kupfer, Nickel und Zink auf. Da es sich bei den Fäll- und Flockungsmitteln üblicherweise um ein Nebenerzeugnis der Metall- beziehungsweise Betonherstellung handelt, können die Konzentrationen der verschiedenen Metalle aber auch die Konzentrationen der Verunreinigungen mehr oder weniger stark variieren. Daher sind die Ergebnisse der Bindungsmessungen mit den kommerziellen Mitteln nur bedingt miteinander vergleichbar, da keine genauen Angaben über die Zusammensetzung des jeweiligen Mittels getroffen werden können. Um dies auszugleichen, wurde eine mittlere Konzentration der verschiedenen Bestandteile angenommen, um daraus die jeweiligen Bindekonstanten der Stoffe berechnen zu können.

Die Bindungsmessungen mit den komplexen Fäll- und Flockungsmittellösungen zeigten deutlich eine Bindung von deren Substanzen an die spezifische Bindestelle von MppA. Um genauere Aussagen über die jeweilige Wirksubstanz der komplexen Lösungen treffen zu können, wurden weitere Bindungsmessungen mit den jeweiligen Einzelkomponenten der zuvor untersuchten Lösungen durchgeführt. Zusätzlich ließen sich die Bindungsuntersuchungen der verschiedenen Einzelkomponenten der kommerziellen Fäll- und Flockungsmitteln aufgrund ihrer definierten Konzentrationen und Zusammensetzungen besser vergleichen als die vorherigen Messungen mit den auf Kläranlagen verwendeten komplexen Lösungen.

Die Titrationsmessungen von MppA mit den Einzelkomponenten der komplexen Fäll- und Flockungsmitteln zeigten, dass besonders das Kation der verschiedenen Substanzen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der Bindestelle im Kanal von *Microthrix parvicella* spielt. Die Bindungsstärke der Kationen an die spezifische Bindestelle von MppA war dabei umso größer, je höher die Wertigkeit des jeweiligen Kations war. Zweiwertige Kationen zeigten eine deutlich schwächere Bindung an die Bindestelle und somit eine leichtere Abnahme der Leitfähigkeit im Black Lipid Bilayer als eine Bindung von dreiwertigen Kationen. Einwertige Kationen zeigten sogar so gut wie überhaupt keine Bindung an die Bindestelle von MppA. Da der spätere Austausch des jeweiligen Anions der untersuchten Einzelkomponenten keinen Einfluss auf die Stärke der jeweiligen Substratbindung hatte, liegt

die Vermutung nahe, dass nur mehrwertige Kationen (speziell dreiwertige und mit Abstrichen auch zweiwertige Kationen) gezielt an die Bindestelle von MppA gebunden werden. Für diese gezielte Bindung von mehrwertigen Kationen an die Bindestelle im Kanal sprechen auch die gefundenen Ladungsverhältnisse. Wie bereits in Abschnitt 5.5 und 5.6 beschrieben lassen die Ergebnisse der Selektivitätsmessungen und die Messungen der Spannungsabhängigkeiten eine stark negative Ladungswolke im Bereich der Bindestelle von MppA vermuten. Kommt es nun zu einer Bindung von mehrwertigen Kationen wie Eisen oder Aluminium an die geladene Bindestelle, werden die negativen Ladungen im Bereich der Bindestelle abgeschirmt, wodurch der Kanal insgesamt einen Überschuss an positiven Ladungen aufweist.

Interessant sind Beobachtungen auf Kläranlagen, wonach die Fällmittel oftmals nur bei saurer Zugabe Wirkung in Bezug auf das übermäßige Wachstum von *Microthrix parvicella* zeigen. Eine neutrale oder alkalische Zugabe der Substanzen in das Belebungsbecken hat hingegen keinen Einfluss auf den Organismus und somit auch nicht auf die Absetzeigenschaften des Belebtschlammes.

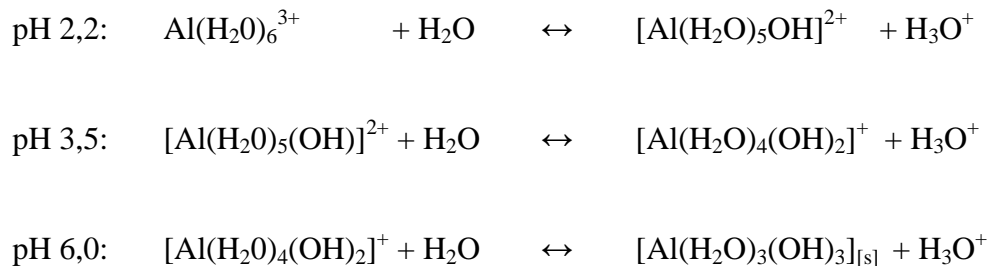
Die pH-Abhängigkeit der Fäll- und Flockungsmittelwirkung auf *Microthrix parvicella* konnte auch bei diversen Versuchen mit dem Black Lipid Bilayer in dieser Arbeit bestätigt werden. Nur eine leicht saure Zugabe der Fäll- und Flockungsmittel, aber auch der jeweiligen Einzelsubstanzen (pH-Werte zwischen 4 und 6), führte zu einer Bindung von mehrwertigen Kationen an die Bindestelle von MppA und somit zu einer Abnahme der gemessenen Leitfähigkeit. Eine Zugabe der Substanzen zur Lipidmembran im neutralen oder alkalischen pH-Bereich hatte hingegen wie beschrieben keine Bindung im Kanal und somit keine Abnahme der gemessenen Leitfähigkeit zur Folge.

Die beschriebene pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung mehrwertiger Kationen an die Bindestelle von MppA lässt sich auf Kanalebene gut erklären. Durch den leicht sauren pH-Wert der zugegebenen Lösungen könnten Konformationsänderungen der Aminosäuren innerhalb des Kanals auftreten. Die Aminosäuregruppen, welche teilweise in das Kanalinnere gerichtet sind, könnten protoniert werden und dadurch den Innenaufbau des Kanals verändern. Sterische Behinderungen durch Aminosäuregruppen könnten wegfallen, verschiedene funktionelle Aminosäuregruppen könnten abgeschirmt werden oder aber die allgemeine Zusammensetzung der Aminosäuregruppen im Kanal könnte durch die Protonierung geändert werden.

Wichtig für das Verständnis der pH-Abhängigkeit der Fäll- und Flockungsmittelwirkung auf MppA ist aber auch das generelle Verhalten von Metallionen in wässrigen Lösungen. Die kleinen Ionenradien der Metalle gepaart mit der gleichzeitig starken Ladung führen zu einer

hohen Ladungsdichte. Diese hohe Ladungsdichte hat zur Folge, dass die Metallionen in wässriger Lösung üblicherweise als Kationsäure vorliegen. Die Metallionen wie beispielsweise Al^{3+} -Ionen oder Fe^{3+} -Ionen binden dabei Wassermoleküle und formen somit das sogenannte Hexaaqua-Ion $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ bzw. $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. In Abhängigkeit des pH-Wertes können nun Konformationsänderungen des Hexaaqua-Ions auftreten. Durch Anheben des pH-Wertes und dem daraus folgenden stufenweisen Protonierungsprozess des Hexaaqua-Ions kommt es schließlich bei einem pH-Wert von größer 6 zur Abscheidung von unlöslichem, neutral geladenem Metallhydroxid wie beispielsweise Aluminiumhydroxid $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder auch Eisenhydroxid $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Das Verhalten von Aluminium aber auch von Eisen in wässrigen Lösungen ist somit stark vom pH-Wert des vorliegenden Mediums und somit der Protonierungsstufe der jeweiligen Metalle abhängig.

In den nachfolgenden Reaktionsgleichungen sollen drei der möglichen Protolysestufen des Hexaaqua-Ions in Abhängigkeit des pH-Wertes anhand von Aluminiumsalzen aufgezeigt werden (Follmann und Grahn 1999). Gleiches gilt natürlich auch analog für die Protolysestufen des Hexaaqua-Ions von Eisensalzen.



Obwohl die pH-Abhängigkeit von Metallsalzen wie Aluminium und Eisen in wässrigen Lösungen Hinweise auf die pH-Abhängigkeit der Wirkung von metallhaltigen Fäll- und Flockungsmitteln auf *Microthrix parvicella* geben kann, sind diese Befunde nur partiell auf die Wirkung dieser Lösungen in Belebtschlammbecken übertragbar. Durch die üblicherweise großen Beckenvolumina gepaart mit hohen Turbulenzen (z.B. durch Strömung, Rührwerke, Oberflächen- oder Druckbelüftung) sollten keine signifikanten pH-Wert-Änderungen durch Zugabe der stark sauren Fäll- und Flockungsmitteln an der Zelloberfläche von *Microthrix parvicella* zu erwarten sein. Ein starkes Absinken des pH-Wertes im Belebungsbecken sollte sogar vielmehr vermieden werden, da es sonst zu erheblichen Störungen der Belebtschlammbiozönose und entsprechend der Reinigungsleistung der Kläranlage kommen

kann. Durch die Zugabe der sauren Lösungen kann es wenn überhaupt nur lokal und zeitlich begrenzt an der Dosierstelle zu einem geringen Absinken des pH-Wertes im Medium kommen.

Die Folgen beziehungsweise die Effekte der im Black Lipid Bilayer gemessenen Bindung mehrwertiger Kationen wie Eisen und Aluminium an die Bindestelle von MppA müssen kontrovers diskutiert werden. Mehrere Auswirkungen und Folgen für den Organismus sind dabei denkbar und müssen daher nachfolgend einander gegenüber gestellt werden.

Zunächst einmal wäre es möglich, dass sowohl Aluminium als auch Eisen durch die kompetitive Bindung an die spezifische Bindestelle von MppA durch den Kanal hindurch in die Zelle gelangen könnten, wodurch direkte Effekte auf die Physiologie des Organismus entstehen würden. Speziell Eisen wird von vielen Organismen als Spurenelement benötigt. Eisen ist beispielsweise wichtiger Bestandteil von Hydrogenasen, Nitrogenasen, Katalasen oder den Komplexen der Atmungskette. Da Eisen als Spurenelement oftmals in nur sehr geringen Mengen im umgebenden Medium vorhanden ist, könnte *Microthrix parvicella* zu dessen effektiver Aufnahme einen Kanal mit einer Bindestelle für Eisen in seiner Lipidmembran ausbilden. Dadurch wäre eine hohe Aufnahmerate von Eisen bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen im Medium gewährleistet.

Wenn beide Metallionen, d.h. Eisen und Aluminium, gleichzeitig im Medium vorhanden sind, wäre es nun denkbar, dass die Metallionen um die spezifische Bindestelle von MppA konkurrieren. Aluminium und Eisen sind jeweils dreiwertige Kationen und könnten daher beide aufgrund ihrer durchaus ähnlichen Struktur kompetitiv an die Bindestelle im Kanal binden. Wird nun Aluminium anstelle von Eisen mit Hilfe der Bindung an die spezifische Bindestelle durch den Kanal geschleust, wären direkte Auswirkungen auf die Physiologie des Organismus die Folge. Das Aluminium würde das Eisen in den Metall-Enzymen des Organismus verdrängen und somit die Strukturen und die Wechselwirkungen der Enzym-Substrat-Komplexe verändern. Dadurch könnte die Funktionalität dieser Komplexe gestört werden, was eventuell verschiedene physiologische Veränderungen wie ein komplettes Absterben, eine massive Wachstumshemmung oder generelle Störungen im Stoffwechsel zur Folge haben könnte.

Neben der beschriebenen Funktionalitätsstörung wäre auch ein direkter toxischer Effekt durch die Aufnahme von Aluminium für den Organismus *Microthrix parvicella* möglich. So konnten Jones und Kochian beispielsweise einen zytotoxischen Effekt von Aluminium bei Pflanzen und Mikroorganismen feststellen, wenn dieses anstelle von Eisen durch den Organismus aufgenommen und genutzt wurde (Jones und Kochian 1997). Jones und Kochian

gehen jedoch davon aus, dass die Toxizität von Aluminium in Bezug auf den Organismus nicht durch eine Interaktion mit enzymatischen, katalytischen Metallbindestellen hervorgerufen wird, sondern vielmehr durch eine Interaktion mit spezifischen Membranlipiden.

Für die These der kompetitiven Bindung von Aluminium und Eisen an die Bindestelle von MppA würde auch sprechen, dass hauptsächlich Aluminiumverbindungen und nicht Eisenverbindungen auf Kläranlagen bei der Bekämpfung von Schwimm- und Blähschlamm zu erfolgreichen Ergebnissen führen. Dies konnte u.a. durch Arbeiten von Paris (Paris 2005) und Schade und Lemmer (Schade und Lemmer 2005; Schade und Lemmer 2006) bestätigt werden. Es konnte festgestellt werden, dass eine Aufnahme von Aluminium durch den Organismus direkte beziehungsweise indirekte negative Auswirkungen auf die Lipaseaktivität von *Microthrix parvicella* hat. Nach Zugabe von Aluminiumchlorid in wässriger Lösung konnte Paris neben einer Abnahme der bakteriellen Lipaseaktivität zusätzlich eine Verschlechterung des allgemeinen physiologischen Zustands der Bakterien feststellen, wodurch es schließlich zu einer Stagnation des gesamten Wachstums kam. Als Ursache für die Abnahme der Lipaseaktivität bei Zugabe aluminiumhaltiger Substanzen zum Organismus führte Paris die Anlagerung und den Einschluss lipophiler Stoffe und Fäden in einer hydrophilen Matrix an. Durch diese hydrophile Matrix würde die Adhäsion zwischen den Filamenten und dem spezifischen Substrat im Medium unterbunden. Hydrolysierbares Substrat in Form von langkettigen Fettsäuren wäre somit schlechter verfügbar, was somit einen schädlichen Versorgungsengpass für den auf langkettige Fettsäuren angewiesenen Organismus *M. parvicella* zur Folge hätte.

Auch die pH-Abhängigkeit der Aluminiumverbindungen konnte durch Paris (Paris 2005) sowie weiteren Gruppen (Jones und Kochian 1997; Pernitsky und Edzwald 2000) beobachtet werden. Keine Gruppe konnte dabei aber einen Zusammenhang zu einer Bindung dieser Stoffe in einem Kanal von *Microthrix parvicella* zeigen. Vielmehr begründeten sie die pH-Abhängigkeit der Aluminiumverbindungen allgemein über eine geringere Aluminiumlösbarkeit bei pH-Werten größer 6, welche auch in dieser Arbeit schon beschrieben wurde.

Neben dem direkten toxischen Effekt von Aluminium wäre auch eine Blockierung von MppA als denkbarer Effekt möglich. Durch die Bindung der mehrwertigen Kationen im Kanal von *M. parvicella* würde der Durchgang so weit verkleinert werden, dass andere Stoffe nicht mehr den Kanal passieren könnten. Besonders die für den Organismus notwendige Aufnahme von Eisen würde verhindert werden, wenn Aluminium anstelle von Eisen an die Bindestelle im

Kanal binden und somit die Bindestelle aber auch den kompletten Kanal blockieren würde. Durch die Blockierung könnte es somit zu einem Eisenmangel im Organismus und als Folge dessen zu einem verschlechterten physiologischen Zustand von *Microthrix parvicella* kommen. Die Folgen des Eisenmangels wären ein verschlechtertes Wachstum bis hin zur gänzlichen Stagnation des Wachstums, wodurch die fädigen Organismen gegenüber den flockenbildenden Organismen im Belebtschlamm einen Wettbewerbsnachteil hätten und nicht mehr übermäßig stark wie bei der Schwimm- und Blähschlamm-Bildung wachsen könnten. Diese Blockierung des Kanals durch eine Bindung von Aluminium könnte ausreichend sein, um ein übermäßiges Wachstum von *Microthrix parvicella* zu verhindern, da der Organismus selbst bei optimalen Wachstumsbedingungen nur geringe Wachstumsraten zeigt.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSSICHTEN

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Erkenntnisse über den Organismus *Microthrix parvicella* sowie dessen Kanalprotein MppA gewonnen werden, die noch einmal kurz in diesem Kapitel aufgezeigt werden sollen.

Zunächst konnte eine Reinkultur von *Microthrix parvicella* erfolgreich angezogen werden, die auf einem rein chemischen Medium basierte. Üblicherweise verwendete Belebtschlammhydrolysate zeigten bereits vor der Animpfung mit den fädigen Organismen porenformende Aktivitäten in Einzelkanalmessungen und stellten sich daher als unbrauchbar für die Experimente mit der Black Lipid Bilayer Apparatur dar. Trotz der erfolgreichen Anzucht eignete sich *Microthrix parvicella* als Reinkultur jedoch nur bedingt für molekularbiologische Arbeiten. Aufgrund der vergleichsweise sehr langsamen Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus konnten erst nach drei bis vier Wochen Inkubationszeit ausreichend große Kulturen geerntet werden. Zusätzlich ist das Problem der Kontamination der Kulturen bei langen Inkubationszeiten zu beachten.

Aus den Reinkulturen konnte nach dem Aufschluss der Bakterien die Zellwand von der Cytoplasmamembran getrennt werden. Mit Hilfe verschiedener Aufreinigungsschritte konnte anschließend aus der abgetrennten Zellwand von *M. parvicella* ein Protein namens MppA mit einem Molekulargewicht von 60 kDa isoliert werden, das für die Bildung von wassergefüllten Kanälen in Lipidmembranen verantwortlich war. Das Porin MppA wurde durch Messungen an der Black Lipid Bilayer Apparatur in Form von Einzelkanalmessungen, Selektivitätsmessungen, Spannungsabhängigkeitsmessungen und Bindungsmessungen vollständig biophysikalisch charakterisiert. MppA zeigte dabei u.a. eine Einzelkanalleitfähigkeit von 600 pS in 1 M Kaliumchlorid, eine wechselnde Selektivität in Abhängigkeit einer Bindung von mehrwertigen Kationen im Kanal und eine symmetrische Spannungsabhängigkeit bereits bei niedrigen Spannungen.

Bei Bindungsexperimenten mit Hilfe der Titrationsmethode konnte eine Bindestelle von MppA für mehrwertige Kationen wie Aluminium oder Eisen, die allesamt Bestandteile von handelsüblichen Fäll- und Flockungsmitteln sind, gezeigt werden. Dreiwertige Kationen zeigten dabei höhere Bindekonstanten als zweiwertige Kationen. Bei einwertigen Kationen konnte eine Abnahme der Leitfähigkeit so gut wie nicht festgestellt werden. Dies beweist, dass die auf Kläranlagen verwendeten Fäll- und Flockungsmittel in Form von Aluminium-

und Eisensalzen zumindest teilweise durch den Kanal von *Microthrix parvicella* aufgenommen werden.

Da Eisen von vielen Organismen als Spurenelement benötigt wird, könnte *Microthrix parvicella* den in dieser Arbeit gefundenen Kanal MppA für eine effektive Aufnahme von Eisen in der Membran ausbilden. Dieser spezifische Kanal mit einer Bindestelle für mehrwertige Kationen würde somit eine gute Aufnahme von Eisen auch bei niedrigen Konzentrationen im umgebenden Medium gewährleisten. Vorstellbar wäre nun eine kompetitive Bindung von Aluminium und Eisen an die Bindestelle im Kanal. Dadurch könnte Aluminium anstelle von Eisen an die Bindestelle im Kanal binden, den Kanal partiell blockieren und somit die benötigte Aufnahme von beispielsweise Eisen durch den Organismus verhindern.

Neben einer partiellen Blockierung des Kanals durch eine Bindung von Aluminium könnte Aluminium auch anstelle von Eisen aufgenommen und in den verschiedenen Metallkomplexen eingebaut werden, wodurch diese inaktiv werden beziehungsweise eine toxische Wirkung erhalten könnten. Dies hätte eine deutliche Verringerung des Wachstums von *Microthrix parvicella* oder unter Umständen sogar das Absterben des Organismus zur Folge.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit eine pH-Abhängigkeit der Bindung dreiwertiger Kationen im Kanal von *Microthrix parvicella* gezeigt werden. Nur bei Zugabe der Metalllösungen in sauren pH-Bereichen (pH kleiner 6) konnte eine Bindung von mehrwertigen Kationen an der Bindestelle im Kanal beobachtet werden. Eine Zugabe im neutralen oder alkalischen pH-Bereich führte zu keiner nennenswerten Abnahme der Leitfähigkeit in Bindungsmessungen. Dies lässt sich auf molekularer Ebene mit eventuellen Konformationsänderungen der Aminosäuren innerhalb der Pore erklären oder aber auch mit dem Verhalten von Metallkationen in wässrigen Lösungen. Die pH-abhängige Wirkung der Fäll- und Flockungsmittel auf Kläranlagen kann damit jedoch nicht begründet werden. Der Verdünnungseffekt der Fäll- und Flockungsmittel wäre durch die großen Volumina der Belebungsbecken zu stark, wodurch es zu keiner nennenswerten Absenkung des pH-Wertes an der hydrophoben Zelloberfläche von *M. parvicella* kommen sollte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Organismus *Microthrix parvicella* eröffnen die Möglichkeit, mit diesem Wissen spezifischere und weniger toxische Verbindungen und Lösungen herzustellen, um vorhandene, handelsübliche Flockungs- und Fällungsmittel in Kläranlagen durch umweltschonendere Lösungen zu ersetzen. Dadurch könnten die Belastungen für die Vorfluter in Form von giftigen Schwermetallen oder anderen Verunreinigungen weiter gesenkt werden.

Für nachfolgende Arbeiten wäre es interessant, Ähnlichkeiten zwischen *Microthrix parvicella* und anderen Bakterien zu finden, die ebenfalls als Verursacher von Schwimm- und Blähschlamm in kommunalen Kläranlagen gelten. Eventuell könnten Erkenntnisse, die in dieser Arbeit über *Microthrix parvicella* gewonnen wurden, auch auf andere Organismen übertragen werden. Voruntersuchungen zur Bestimmung der Proteinsequenz von MppA wurden bereits für diese Arbeit durchgeführt und müssten daher weiter verfolgt werden. Ein weiteres Ziel könnte es somit sein, eine komplexe Universallösung zu finden, mit der gezielt alle schwimm- und blähschlammverursachenden Bakterien in Kläranlagen bekämpft werden könnten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Andersen, C., Maier, E. et al. (2003). "Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates." *J Biol Chem* 278(27): 24269-76.
- Andreasen, K. und Nielsen, P. H. (1997). "Application of Microautoradiography to the Study of Substrate Uptake by Filamentous Microorganisms in Activated Sludge." *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3662-3668.
- Andreasen, K. und Nielsen, P. H. (1998). "In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography." *Water Sci. Technol.* 37: 19-26.
- Andreasen, K. und Nielsen, P. H. (2000). "Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: Studies of in situ physiology " *Water Res.* 34: 1559-1569.
- ATV-Handbuch (1997). "Biologische und weitergehende Abwasserreinigung." Ernst & Sohn, Wiley-VCH.
- ATV (2000). "German Standard ATV A131E: Dimensioning of single stage activated sludge plants." German Association for Water, Wastewater and Waste: 57 pp.
- Benz, R. (2001). "Porins - structure and function." *Microbial transport systems.* G. Winkelmann, Weinheim/Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH: 227-246.
- Benz, R. und Bauer, K. (1988). "Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins." *Eur J Biochem* 176(1): 1-19.
- Benz, R., Janko, K. et al. (1978). "Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 511(3): 305-19.

- Benz, R., Janko, K. et al. (1979). "Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 551(2): 238-47.
- Benz, R. und Orlik, F. (2004). "Functional reconstitution and properties of specific porins." *Structure and function of prokaryotic and eukaryotic porins*, R. Benz. Weinheim/Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH: 183-212.
- Benz, R., Schmid, A. et al. (1988). "Characterization of the nucleoside-binding site inside the Tsx channel of *Escherichia coli* outer membrane. Reconstitution experiments with lipid bilayer membranes." *Eur J Biochem* 176(3): 699-705.
- Benz, R., Schmid, A. et al. (1986). "Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes." *J Bacteriol* 165(3): 978-86.
- Benz, R., Schmid, A. et al. (1987). "Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane." *J Membr Biol* 100(1): 21-9.
- Blackall, L. L., Stratton, H. et al. (1996). "'Candidatus *Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants." *Int J Syst Bacteriol* 46(1): 344-6.
- Blackbeard, J. R., Ekama, G. A. et al. (1986). "A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa." *Water Poll. Contr.* 85: 90 - 100.
- Casey, T. G., Wentzel, M. C. et al. (1999). "Filamentous organisms bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 11: a biochemical/microbiological model for proliferation of anoxic-aerobic (AA) filamentous organisms." *Water SA* 25: 425-442.
- Casey, T. G., Wentzel, M. C. et al. (1992). "A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge systems." *Water Res* 26: 867-869.
- Chudoba, J., Grau, P. et al. (1973). "Control of activated sludge filamentous bulking. II. Selection of microorganisms by means of a selector." *Water Res* 7: 1389-1406.

- Daigger, G. T. und Nicholson, G. A. (1990). "Performance of four full scale nitrifying wastewater treatment plants incorporating selectors." Res. J. Water Pollut. Cont. Fed. 62: 676-683.
- Dankwerts, P. V. (1953). "Continious flow systems. Distribution of residence time." Chem. Eng. Sci. 2.
- Dörner, U., Schiffler, B. et al. (2009). "Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free Gram-positive bacterium *Corynebacterium amycolatum*." Int Microbiol 12(1): 29-38.
- DVWK-Regelwerk (1988). "Sanierung und Restaurierung von Seen." Merkblatt 213, Paul Parey Verlag.
- Eikelboom, D. und van Buijsen, H. J. J. (1983). "Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung." Hirthammer Verlag (München).
- Eikelboom, D. H. (1975). "Filamentous organisms observed in activated sludge." Water Research 9: 365-388.
- Eikelboom, D. H. (1997). "Control of *Microthrix parvicella* by addition of PAX-14." TNO Institute of Environmental Sciences, Energy Research and Process Innovation, Appeldoorn, The Netherlands.: 35 pp.
- Ekama, G. A., Wentzel, M. C. et al. (1996). "Filamentous organisms bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 6: review, evaluation and consolidation of results." Water SA 22: 147-152.
- Ferenci, T., Schwentorat, M. et al. (1980). "Lambda receptor in the outer membran of *Escherichia coli* as a binding protein for maltodextrins and starch polysaccharides." J. Bacteriol. 142(2):521-526.
- Follmann, H. und Grahn, W. (1999). "Chemie für Biologen: Praktikum und Theorie." Teubner-Verlag.

- Hancock, R. E. und Benz, R. (1986). "Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochim Biophys Acta* 860(3): 699-707.
- Helmer, C. und Kunst, S. (1996). "Grundlagen der vermehrten biologischen Phosphorelimination." *ATV-Schriftenreihe*, Hennef.
- Henze, M., Kristensen, G. H. et al. (1994). "Rate capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes." *Water Sci. Technol.* 29: 101-107.
- Jenkins, D., Richard, M. G. et al. (2004). "Manual on the Causes and Control of Activated sludge Bulking, Foaming and other Solids Separation Problems." Lewis Publishers, Washington DC: 190pp.
- Jones, D. L. und Kochian, L. V. (1997). "Aluminium interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity." *FEBS Lett* 400(1).
- Kim, B., Andersen, C. et al. (2001). "Identification of a cell wall channel of *Streptomyces griseus*: the channel contains a binding site for streptomycin." *Mol Microbiol* 41(3): 665-73.
- Kristensen, G. H., Jørgensen, P. E. et al. (1994). "Settling characteristics for activated sludge in Danish treatment plants with biological nutrient removal." *Water Sci. Technol.* 29: 157-165.
- Kruit, J., Hulsbeek, J. et al. (2002). "Bulking sludge solved?!" *Water Sci Technol* 46(1-2): 457-64.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680 - 685.
- Lee, N., Nielsen, P. H. et al. (1999). "Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analysis in microbial ecology." *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289-1297.

- Lemmer, H. und Baumann, M. (1988). "Scum actinomycetes in sewage treatment plants: Part 2: The effect of hydrophobic substrate." *Water Res* 22: 761 - 763.
- Lemmer, H. und Kroppenstedt, R. M. (1984). "Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge." *Syst Appl Microbiol* 5: 124 - 135.
- Lemmer, H., Müller, E. et al. (2001). "*Microthrix* scum in low load nutrient removal plants: what do these filaments feed on?" In: Proceedings of the 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in activated sludge and biofilms processes, Poster no.74, Rome, Italy.
- Levin, G. V. und Shapiro, J. (1965). "Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms." *Journal WPCF* 37: 800-821.
- Ludwig, O., De Pinto, V. et al. (1986). "Pore formation by the mitochondrial porin of rat brain in lipid bilayer membranes." *Biochim Biophys Acta* 860(2): 268-76.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. et al. (2001). "Brock-Mikrobiologie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 8. Auflage.
- Madoni, P. und Davoli, D. (1993). "Control of *Microthrix parvicella* growth in activated sludge." *FEMS Microbiol. Ecol.* 12: 277-284.
- Maier, C., Bremer, E. et al. (1988). "Pore-forming activity of the Tsx protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Demonstration of a nucleoside-specific binding site." *J Biol Chem* 263(5): 2493-9.
- Martins, A. M., Pagilla, K. et al. (2004). "Filamentous bulking sludge - a critical review." *Water Res* 38(4): 793-817.
- Miana, P., Grando, L. et al. (2002). "*Microthrix parvicella* foaming at the Fusina WWTP." *Water Sci. Technol.* 46: 499-502.
- Mizuno, T. und Kageyama, M. (1978). "Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biochem.*; 84 (1): 179-91.

- Nielsen, P. H., Roslev, P. et al. (2002). "*Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants." *Water Sci Technol* 46(1-2): 73-80.
- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 593-656.
- Nikaido, H. und Nakae, T. (1979). "The outer membrane of gram-negative bacteria." *Adv Microb Physiol* 20: 163 - 250.
- Paris, S. (2005). "Bekämpfung von Schwimmschlamm, verursacht durch *Microthrix parvicella*." Dissertation an der Technischen Universität München.
- Pernitsky, D. J. und Edzwald, J. K. (2000). "Polyaluminium chloride - Chemistry and Selection." In Proc. of the AWWA Annual Conference, Denver, Colorado.
- Quémeneur, M. und Marty, Y. (1994). "Fatty acids and sterols in domestic wastewater." *Water Res.* 28.
- Raunkjær, K., Nielsen, P. H. et al. (1994). "Measurement of pools of protein carbohydrate and lipid in domestic wastewater." *Water Res.* 28: 251-262.
- Richard, M. G. (1989). "Activated sludge microbiology." J. Water Pollut. Cont. Fed., Alexandria, VA: 73 pp.
- Roels, T., Dauwe, F. et al. (2002). "The influence of PAX-14 on activated sludge systems and in particular on *Microthrix parvicella*." *Water Sci Technol* 46(1-2): 487-90.
- Rossetti, S., Christensson, C. et al. (1997). "Phenotypic and phylogenetic description of an Italian isolate of "*Microthrix parvicella*"." *J Appl Microbiol* 82(4): 405-10.
- Rossetti, S., Tomei, M. C. et al. (2002). ""*Microthrix parvicella*": a new approach for kinetic and physiological characterization." *Water Sci Technol* 46(1-2): 65-72.
- Rossetti, S., Tomei, M. C. et al. (2005). ""*Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge." *FEMS Microbiol Rev* 29(1): 49-64.

- Schade, M. und Lemmer, H. (2005). "Lipase activities in activated sludge and scum - comparison of new and conventional techniques." *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 33 (3), 210-215.
- Schade, M. und Lemmer, H. (2006). "In situ enzyme activities of filamentous scum bacteria in municipal activated sludge wastewater treatment plants." *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 34, 480-490.
- Schönberger, R. (1988). "Optimierung der biologischen Phosphorelimination bei der kommunalen Abwasserreinigung." *Berichte aus Wassergütewirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen der TU München* 93.
- Schönberger, R. (1989). "Optimierungsmöglichkeiten bei der biologischen Phosphorelimination." *GWF-Wasser-Abwasser* 2/89: 49-55.
- Singer, S. und Nicolson, G. L. (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175: 720 - 731.
- Slijkhuis, H. (1983). "*Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium." *Appl Environ Microbiol* 46(4): 832-9.
- Slijkhuis, H. (1983). "The physiology of the filamentous bacterium *M. parvicella*." Ph.D. thesis, Agriculture College of Wageningen, The Netherlands.
- Slijkhuis, H. und Deinema, M. H. (1988). "Effect of environmental conditions on the occurrence of *Microthrix parvicella* in activated sludge." *Water Res.* 22: 825-828.
- Stryer, L., Tymoczko, J. L. et al. (2003). "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Tandoi, V., Rossetti, S. et al. (1998). "Some physiological properties of an Italian isolate of *Microthrix parvicella*." *Water Sci. Technol.* 37: 1-8.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. et al. (2002). "Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse." fourth ed. McGraw-Hill: 1830 pp.

- Vacker, D., Connell, C. H. et al. (1967). "Phosphate removal through municipal wastewater treatment at San Antonio, Texas." *Journal WPCF* 39: 750-771.
- Van Veen, W. L. (1973). "Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria." *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 189-205.
- Wagner, F. (1982). "Verhinderung und Bekämpfung der Blähschlamm Bildung in Belebungsanlagen." *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 76.
- Wanner, J. (1994). "Activated Sludge Bulking and Foaming Control." Technomic Publishing, Pennsylvania: 327pp.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 16.
- Wentzel, M. C. (1992). "Sludge bulking in nutrient removal systems." *IAWQ Nutrient Removal Newslett.* 2: 7-13.
- Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." *Anal Biochem* 138: 141 - 143.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Fließschema einer kommunalen Kläranlage mit Vorklärung und Faulung (von der Homepage des Bundesverbandes für Gas und Wasser, 2010). Nach einer zunächst mechanischen Reinigung wird das Abwasser in der biologischen Reinigungsstufe insbesondere von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen befreit. Der in der mechanischen und biologischen Reinigungsstufe anfallende Klärschlamm kann zur Faulgasproduktion anaerob verwertet werden. 12
- Abbildung 2: Recheneinheit zur Entfernung von Grob- und Müllstoffen aus dem Abwasser. (Foto: Knaf)..... 13
- Abbildung 3: Belüfteter Sandfang einer kommunalen Kläranlage mit integriertem Fettfang (rechts). Durch Erzeugung einer kreisförmigen Strömungsbewegung im Sandfang flotiert das Fett im nicht belüfteten Fettfang und kann dort an der Wasseroberfläche abgezogen werden. (Foto: Knaf) 14
- Abbildung 4: Vorklärung zur Abtrennung von Feststoffen aus dem Abwasser, wodurch bereits große Mengen des CSBs eliminiert werden können. Aufgrund einer gradientenförmigen Herabsetzung der Fließgeschwindigkeit setzen sich schwerere Feststoffe am Beckenboden ab beziehungsweise leichtere Feststoffe schwimmen an der Wasseroberfläche auf und können somit dem Abwasser entzogen werden. (Foto: Knaf) 15
- Abbildung 5: Belebungsbecken einer kommunalen Kläranlage in der belüfteten Phase. (Foto: Knaf)..... 16
- Abbildung 6: Schema für den Abbau von Phosphor durch polyphosphatspeichernde Bakterien nach Helmer und Kunst (Helmer und Kunst 1996). Für die Aufnahme und Rücklösung von Phosphat müssen die polyphosphatspeichernden Bakterien aerobe und anaerobe Phasen durchlaufen. 20
- Abbildung 7: Verlauf der Phosphatkonzentration im Belebungsbecken über die Zeit bei der biologischen Phosphatelimination (Schönberger 1988; Schönberger 1989). In der aeroben Phase nehmen die polyphosphatspeichernden Bakterien mehr Phosphat aus dem Medium auf als sie vorher in der anaeroben Phase als Stressreaktion rückgelöst haben. 21
- Abbildung 8: Nachklärbecken einer kommunalen Kläranlage zur Abtrennung des Belebtschlammes vom gereinigten Wasser. Durch Herabsetzen der Fließgeschwindigkeit sedimentiert der Belebtschlamm zum Beckenboden. Das verbleibende, gereinigte Wasser wird in den Vorfluter geleitet. (Foto: Knaf) 24
- Abbildung 9: Schwimmschlammdecke auf der Oberfläche eines Belebungsbeckens während der unbelüfteten Phase. Aufgrund nicht ausreichend hoher Dichte des Belebtschlammes kann sich dieser nicht mehr komplett absetzen und schwimmt an der Oberfläche auf (Schwimmschlamm) bzw. schwebt im Wasser (Blähschlamm). (Foto: Knaf) 25
- Abbildung 10: *Sphaerotilus natans*, Lebend-präparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de, 2010). 26

Abbildung 11: Typ <i>021N</i> , Lebendpräparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de , 2010).	26
Abbildung 12: <i>Microthrix parvicella</i> , Lebend-präparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de , 2010).	27
Abbildung 13: <i>Nostocoida limicola</i> , Lebend-präparat, Phasenkontrast (www.zerberus-online.de , 2010).	27
Abbildung 14: Schwimmschlammdecke auf einem Belebungsbecken (www.zerberus-online.de , 2010). Durch Anlagerung von Gasbläschen an den Belebtschlamm flotierte der Schlamm an die Wasseroberfläche.	28
Abbildung 15: Neisserfärbung einer Belebtschlammstruktur, Lebendpräparat, Phasenkontrast. Fädige Organismen dienen als Rückgrat für die Flockenbildung und sind daher trotz der durch sie hervorgerufenen Probleme essenziell für die Belebtschlammbiozönose. (Bild: Knaf).....	29
Abbildung 16: Reinkultur von <i>Microthrix parvicella</i> (entnommen von der Homepage des Landesamts für Umwelt Bayern, 2011).	31
Abbildung 17: Maximale Wachstumsrate von <i>Microthrix parvicella</i> als Funktion der Temperatur für die Stämme 4B und RN1 (Rossetti et al. 2002).	32
Abbildung 18: Abhängigkeit der Wachstumsrate flockiger und fädiger Organismen von der Substratkonzentration nach Chudoba et al, 1973. Fadenbakterien zeigen aufgrund ihrer höheren Substrataffinität Wachstumsvorteile bei niedriger Substratverfügbarkeit.	37
Abbildung 19: Vergleich des Zellhüllenaufbaus grampositiver und gramnegativer Bakterien. Gramnegative Bakterien besitzen im Vergleich zu den grampositiven Bakterien eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere und nur eine dünne Peptidoglykanschicht. (von http://www.cals.cornell.edu/cals/micro/research/labs/angert-lab/images/cellwall1.jpg , 2012).....	41
Abbildung 20: Aufbau und Dimension einer Lipidmembran (entnommen von www.uni-stuttgart.de , 2011). Die Lipide zeigen einen charakteristischen, amphiphilen Aufbau mit einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz aus Fettsäuren.	42
Abbildung 21: Allgemeine Struktur der Phosphoglyceride. Die Reste R1 und R2 bestimmen die Fettsäuren, der Rest X bestimmt die Klasse (www.wikipedia.org , 2011).	42
Abbildung 22: Struktur der Glykolipide sowie der Untergruppen Glycero- und Sphingoglykolipide (www.wikipedia.org , 2011).	43
Abbildung 23: Struktur von Cholesterinen (Cholesterol) (www.wikipedia.org , 2011).	43
Abbildung 24: Laterale Diffusion von Membranlipiden ($v = 10^{-7}$ s). Ermöglicht den Austausch von Lipiden innerhalb einer Schicht. (http://www.uni-stuttgart.de/bio/bioinst/biophysik/lehre/skripte/physikalisch_technische_methoden/pdf/versuch_7.pdf , 2011)	44
Abbildung 25: Transversale Diffusion von Membranlipiden ($v \gg 1$ d). Ermöglicht den Austausch von Lipiden zwischen den Schichten. (http://www.uni-	

stuttgart.de/bio/bioinst/biophysik/lehre/skripte/physikalisch_technische_methoden/pdf/versuch_7.pdf, 2011).....	44
Abbildung 26: Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran gemäß Singer und Nicolson. (http://www.nature.com/horizon/livingfrontier/background/images/membrane_f2.jpg , 2011).....	46
Abbildung 27: Seitenansicht eines LamB- Monomers (Maltoporin). Die β -Stränge sind grau dargestellt, die Wendungen zwischen zwei β -Strängen rot. Externe Schleifen sind verschieden farbig dargestellt und durchnummeriert. (aus http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/fileadmin/REPORT/BIOTE/biote015.htm , 2012).....	47
Abbildung 28: Vergleich der Fließgeschwindigkeiten bei allgemeinen Diffusionsporen und Poren mit Bindestellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (aus http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2009/3891/pdf/klaecktadiss.pdf , 2012).....	48
Abbildung 29: Aufbau einer typischen SDS-PAGE-Apparatur (Bild aus www.ibm-jena.de , 2011).....	58
Abbildung 30: Schematische Darstellung der für den Nachweis der porenbildenden Eigenschaften der Proteine verwendeten Teflonkammer und Bilayerapparatur (Lehrstuhl für Biotechnologie, AG Benz, Universität Würzburg).	64
Abbildung 31: Aufbau der Black Lipid Bilayer Apparatur am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg (Lehrstuhl für Biotechnologie, AG Benz, Universität Würzburg).	65
Abbildung 32: Das Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin (DiphPC) für die Erzeugung künstlicher Lipidmembranen (http://avantilipids.com/images/structures/850356s.gif , 2012).....	66
Abbildung 33: Ergebnisse der 16-stündigen Sucrosegradientenzentrifugation zur Bestimmung der verschiedenen Membranfraktionen mit NADH-Oxidase-Aktivität und zugehöriger Bilayer-Aktivität. Dazu wurde eine Sucrosegradientenzentrifugation mit Sucrosegehalten von 30 % (w/v, 3 ml), 50 % (w/v, 4 ml) und 70 % (w/v, 3 ml) durchgeführt. 7 Fraktionen wurden gesammelt. Fraktion 3 beinhaltet die höchste NADH-Oxidase-Aktivität, Fraktion 5 die höchste porenformende Aktivität.....	76
Abbildung 34: Proteinbandenmuster der verschiedenen Sucrosegradientenfraktionen, erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Dazu wurden jeweils 200 μ l der Fraktionen nach Wessel und Flügge gefällt (Wessel und Flügge 1984) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.	77
Abbildung 35: Proteinbandenmuster der einzelnen Waschschrte von Fraktion 5 des Sucrosegradienten, erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Dazu wurden jeweils 200 μ l der einzelnen Waschschrte (s. Legende rechts) nach Wessel und Flügge gefällt (Wessel und Flügge 1984) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt.	78
Abbildung 36: Typischer Verlauf des ersten FPLC-Laufes (Bio-Rad) mit einer Anionenaustauschersäule (MonoQ 5/50 GL, GE Healthcare). Aufgetragen auf die Säule wurde der Überstand der Detergenzienwaschung mit 1 % LDAO. Für das Anlegen eines	

- Salzgradienten wurde eine 1 M Natriumchloridlösung mit 1 % LDAO verwendet, wodurch die Proteine gemäß ihrer Bindungsstärke zur Säulenmatrix von der Säule gewaschen wurden. Dies führte zu einer Separierung der Proteine. Die Peaks der blauen UV-Extinktionskurve weisen auf Proteinfractionen hin. Die schwarz dargestellte Kurve entspricht dem entsprechenden Salzgradienten. Die rote Kurve beschreibt die real anliegende Leitfähigkeit. 80
- Abbildung 37: Proteinbandenmuster von Fraktion 16 des ersten FPLC-Laufes (MonoQ-Säule), erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Aufgetragen wurden 200 µl der Fraktion (gefällt nach Wessel und Flügge) und die Proben vor Befüllen der Geltaschen für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt. 81
- Abbildung 38: Typischer Verlauf des zusätzlichen FPLC-Laufes mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex 75 10/300 GL-Säule, GE Healthcare). Aufgetragen auf die Säule wurde Fraktion 16 des vorhergehenden FPLC-Laufes mit der Anionenaustauschersäule. Die Proteine durchwandern mit Hilfe des Waschpuffers unterschiedlich schnell die Diffusionssäule und werden daher in Abhängigkeit ihrer Größe voneinander separiert und gesammelt. Die Peaks der blauen UV-Extinktionskurve weisen auf Proteinfractionen hin. 82
- Abbildung 39: Proteinbandenmuster von Fraktion 15 des zusätzlichen Gelfiltrationslaufes (Superdex 75 10/300 GL-Säule, GE Healthcare), erhalten mit Hilfe einer SDS-PAGE (12 % SDS-Gel). Aufgetragen wurden 200 µl der Superdex-Fraktion 15 (gefällt nach Wessel und Flügge). Zusätzlich wurde die Probe vor Befüllen der Geltaschen zur Denaturierung der Proteine für 10 Minuten gekocht. Das Gel wurde silbergefärbt. 83
- Abbildung 40: Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 1 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Jeder schrittweise Anstieg in der Leitfähigkeit steht dabei für ein Rekonstitutionsereignis des Porins. Die mittlere Einzelkanalleitfähigkeit bei 167 Ereignissen lag bei ca. 600 pS. 84
- Abbildung 41: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des aufgereinigten Porins MppA von *M. parvicella*. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 1 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 167 MppA-Kanalrekonstitutionen betrug ca. 600 pS. 86
- Abbildung 42: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des Porins MppA. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 0,3 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 134 Kanalrekonstitutionen betrug 125 pS. 87
- Abbildung 43: Histogramm der Einzelkanalleitfähigkeiten des Porins MppA. Aufgereinigtes MppA wurde zu einer schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membran gegeben und die Messung in ungepufferter 3 M Kaliumchloridlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von 146 Kanalrekonstitutionen betrug 1700 pS. 87
- Abbildung 44: Lineare Abhängigkeit der Leitfähigkeit des Kanals MppA von der Kaliumchloridkonzentration. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/*n*-

- Dekan-Membranen gegeben und die Messungen in jeweils ungepuffert
Elektrolytlösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. 89
- Abbildung 45: Beispiel für eine Messung der Spannungsabhängigkeit von *cis*-
zugegebenem MppA bei angelegten Spannungen von + 70 mV bis – 70 mV. Die
horizontalen Angaben in mV entsprechen den jeweils angelegten Spannungen, die
vertikalen Angaben in Volt entsprechen dem full scale. Bereits bei einer angelegten
Spannung von + 20 beziehungsweise - 20 mV konnte ein Schließen von MppA in Form
eines Leitfähigkeitsrückganges festgestellt werden. 92
- Abbildung 46: Graphische Auswertung einer Messung der Spannungsabhängigkeit von *cis*-
seitig zugegebenem MppA. Aufgetragen ist das Verhältnis der gemessenen Leitfähigkeit G
zur Ausgangsleitfähigkeit G_0 bei der jeweils angelegten Spannung V_m . Zu erkennen ist
eine typische Glockenkurve mit Schließvorgängen bei angelegter positiver und auch bei
angelegter negativer Spannung. 93
- Abbildung 47: Titration mit dem Fäll- und Flockungsmittel Steinfloc FT (1:100, pH 5,4). Die
Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen
wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer
angelegten Spannung von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Steinfloc FT wurde nach
Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären
Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei
ab einer Zugabe von mindestens 0,2 mM Steinfloc FT detektiert werden. Am Ende der
Messung entsprach die gemessene Leitfähigkeit in etwa der Hälfte der
Ausgangsleitfähigkeit. 94
- Abbildung 48: Titration mit 0,1 M Eisenchlorid (pH 4,6). Die Membran wurde mit Hilfe von
DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten
Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung
von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Die Lösung wurde nach dem Einbau von
mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur
Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei ab einer Zugabe
von mindestens 0,2 mM Eisenchlorid zur Elektrolytlösung detektiert werden. Am Ende
der Messung entsprach die gemessene Leitfähigkeit in etwa der 60 % der
Ausgangsleitfähigkeit. 99

9 TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Chemikalien in handelsüblichen Fäll- und Flockungsmitteln mit Lieferform und weiteren Charakteristika (ATV-Handbuch 1997) 23
- Tabelle 2: Hauptleitfähigkeiten von MppA bei der Messung in unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membranen gegeben und die Messung in jeweils ungepuffertem KCl-Lösung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. Zur statistischen Absicherung wurden mindestens 100 Einzelkanalereignisse ausgezählt. 88
- Tabelle 3: Einfluss des Elektrolyts auf die Leitfähigkeit des Kanals MppA von *Microthrix parvicella*. Aufgereinigtes MppA wurde zu schwarzen DiphPC/*n*-Dekan-Membranen gegeben und die Messung bei 20 mV und 20 °C durchgeführt. 90
- Tabelle 4: Bestimmung der Bindekonstanten für drei ausgewählte, handelsübliche Fäll- und Flockungsmittel. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH ca. 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle Kanalblockierung konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden..... 95
- Tabelle 5: Bestimmung der maximalen Leitfähigkeitsabnahme für drei ausgewählte, handelsübliche Fäll- und Flockungsmittel. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine Abnahme der Leitfähigkeit konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. 96
- Tabelle 6: Bestimmung der maximalen Leitfähigkeitsabnahme für 4 ausgewählte, saure Eisen- und Aluminiumlösungen. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine Abnahme der Leitfähigkeit konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt..... 100
- Tabelle 7: Bestimmung der Bindekonstanten verschiedener Metalllösungen bei Messungen mit MppA. Die Membran wurde mit Hilfe von DiphPC gelöst in *n*-Dekan geformt. Die Messungen wurden in ungepufferten Kaliumchloridlösungen (pH 6 am Ende der Messung) bei einer angelegten Spannung von 20 mV und bei 20 °C durchgeführt. Die Lösungen wurden nach dem Einbau von mindestens 100 Einzelkanälen und nach Erreichen eines stationären Zustandes zur Elektrolytlösung gegeben. Eine partielle

Kanalblockierung konnte dabei für alle untersuchten Lösungen festgestellt werden. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.	101
Tabelle 8: Permeabilitätskoeffizienten von MppA ohne beziehungsweise mit Bindung von trivalenten Kationen im Kanal. Das Membranpotenzial V_m wurde durch Etablierung eines dreifachen Salzgradienten durch Zugabe einer 3 M Kaliumchloridlösung gemessen. Das Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Anionen P_{Kation}/P_{Anion} wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung aus mindestens 3 Messungen ermittelt.....	102

10 ANHANG

10.1 Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Autoklav	KSG
Black Lipid Bilayer-Apparatur	Institutseigenes Entwicklungslabor
Clean-Bench	Gelaire
Elektroden	Metrohm
Elektrometer	Keithley 602
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Amersham Biosciences
(Fein)Waage	Sartorius, Kern
Fernrohr	Spindler und Hoyer
FPLC	Bio-Rad
French Press	SLM Instruments, Inc.
Gel-Dokumentationssystem	lth Labortechnik
Kühlzentrifugen	Beckmann, Heraeus
Küvetten	Institutseigenes Entwicklungslabor
Magnetrührer	Hartenstein
Mikrowelle	Moulinex
Pipetten	Eppendorf, Gilson, SLG, Brand
pH-Meter	WTW
Photometer	Amersham Biosciences,
Schüttler	GFL
Spannungsquellen	Bio-Rad, institutseigenes Entwicklungslabor
Schreiber	Rikadenki
Schwingungsgedämpfter Tisch	Institutseigenes Entwicklungslabor
Tankblot-Apparatur	Bio-Rad
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckmann
UV-Gerät	Stratagene, Amersham Biosciences
Verstärker	Institutseigenes Entwicklungslabor
Vortexer	Hartenstein
Wasserdestillationsanlage	Millipore

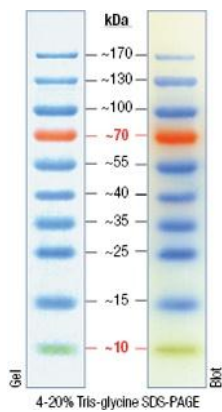
10.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

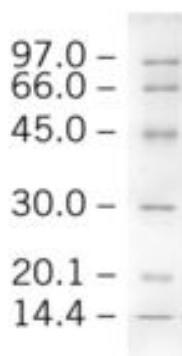
Chemikalien	Sigma, Roth, Merck, Bio-Rad, Difco
Lipide	Avanti Polar Lipids
PVDF-Membran	Roth
Einwegröhrchen	Falcon, Greiner
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Pasteurpipetten	Fortuna
Spritzen	Primo
Handschuhe (Latex, Nitril)	Roth

10.3 Molekulargewichtstandards

Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)



Low molecular weight marker (Amersham)



10.4 Puffer und Lösungen

Die nachfolgenden pH-Werte wurden mit 3 M Salzsäure beziehungsweise 1 M Natronlauge eingestellt.

10.4.1 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE nach Laemmli

Die angegebene Menge für das Sammel- und Trenngel gelten jeweils für die Herstellung von 2 Gelen.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
H ₂ O _{bidest}	1,72 ml	3,3 ml
30 % Polyacrylamid	0,76 ml	4,0 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,76 ml	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5 ml
10 % SDS	0,03 ml	0,1 ml
10 % APS	0,03 ml	0,1 ml
TEMED	0,003 ml	0,004 ml

Laufpuffer (1x Laemmli-Puffer)

Tris	3,1 g
SDS	1,0 g
Glycin	4,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Probenpuffer bzw. REDMIX (4x)

0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
10 % SDS	4,0 ml
β-Mercaptoethanol	1,0 ml
Glycerol	2,0 ml
Bromphenolblau	0,01 %

Farbloser Probenpuffer bzw. farbloser REDMIX (4x) für Gelelektion

0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
10 % SDS	4,0 ml
Glycerol	2,0 ml

10.4.2 Puffer und Lösungen für Färbungen**Coomassie- Färbung**

Färbelösung:	450 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	1 g	Coomassie R250
	ad 2000 ml	H ₂ O _{bidest}

Entfärbelösung:	400 ml	Methanol
	150 ml	Essigsäure
	ad 2000 ml	H ₂ O _{bidest}

Silberfärbung

Lösung A (1x):	20 ml	Ethanol absolut
	25 µl	37 % Formaldehyd
	ad 50 ml	H ₂ O _{bidest}

Lösung B (5x):	0,5 g	Na ₂ S ₂ O ₃
	ad 500 ml	H ₂ O _{bidest}

Lösung C (1x):	0,05-0,08 g	AgNO ₃
	ad 50 ml	H ₂ O _{bidest}

Lösung D (5x):	75 g	Na ₂ CO ₃
	ad 50 ml	H ₂ O _{bidest}

Kolloidales Coomassie-Blau**Fixierung**

TCA 12 %

Stocklösung A

Coomassie-Blau G250 1 %

H₂O_{bidest} ad auf das jeweilige Volumen

Stocklösung B

Stocklösung A 10 ml

(NH₄)₂SO₄ 10 %

H₃PO₄ 2 %

H₂O_{bidest} ad 100 ml

Gebrauchslösung

Stocklösung B 80 ml

Methanol 20 ml

Entfärbung

H₂O_{bidest}

10.4.3 Puffer und Lösungen für den NADH-Oxidase-Test

Inkubationsmischung

Tris HCl pH 7,5	50 mM
NADH	0,12 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,2 mM
Membranfraktion	3 – 100 µg Protein

in einem Volumen von 1 ml.

2 x Puffer

0,1 M Dithiothreitol (DTT)	40 µl
1 M Tris HCl (pH 7,5)	500 µl

auf 10 ml aufgefüllt.

Küvette

2 x Puffer	0,5 ml
H ₂ O _{bidest}	0,4 ml
1,2 mM NADH	0,1 ml

warten bis Wert konstant, dann

Membranfraktion	10 µl
-----------------	-------

Nullwert

2 x Puffer	0,5 ml
H ₂ O _{bidest}	0,5 ml

Modifizierter R2A-Agar (Merck)

Hefeextrakt	0,5 g/l
Proteose-Pepton	0,5 g/l
Casein-Hydrolysat	0,5 g/l
Glucose	0,5 g/l
lösliche Stärke	0,5 g/l
Natrium-Pyruvat	0,3 g/l
K ₂ PO ₄	0,3 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g/l
Agar-Agar	12,0 g/l
Tween 40	0,02 %
H ₂ O _{bidest}	Ad 1000 ml

Das Medium wird 1:2 verdünnt verwendet. Der Agaranteil wird beibehalten und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

10.6 Bakterienstämme

Microthrix parvicella Sta4 (LFU Bayern) (Schade und Lemmer 2006)

Microthrix parvicella MBER6 (LFU Bayern) (Schade und Lemmer 2006)

11 ABKÜRZUNGEN, GRÖSSEN UND EINHEITEN

11.1 Abkürzungen

Allgemein verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
AgNO ₃	Silbernitrat
Al	Aluminium
APS	Ammoniumpersulfat
<i>M. parvicella</i>	<i>Microthrix parvicella</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DiphPC	Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
Fe	Eisen
FPLC	Fast performance liquid chromatography
Fr.	Fraktion
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria-Miller
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid
LiCl	Lithiumchlorid
lmw	low molecular weight
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
N	Stickstoff

Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
O	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
pH	pH - Wert
Prof.	Professor
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	und andere(n)/unter anderem
u.v.m.	und viele(n,s) mehr
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

11.2 Größen und Einheiten

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
A	Ampere
bar	Bar
c	Konzentration [M] oder $[\text{mol l}^{-1}]$
cm	Zentimeter
Da	Dalton
F	Faraday-Konstante ($96500 \text{ A s mol}^{-1}$)
f	Frequenz [Hz]
G	Leitfähigkeit [S]

G_K	Leitfähigkeit pro Kästchen [S]
g	Erdschwerebeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m s}^{-2}$ bei 50° geographische Breite)
g	Gramm
h	Stunde
I	Stromstärke [A]
$k_{1/2}$	Halbsättigungskonstante
l	Liter
M	Molar [mol l^{-1}]
m	Meter
m^2	Quadratmeter
min	Minute
MW	„molecular weight“, Molekulargewicht
mol	Mol
n	Anzahl
P	Permeabilitätskoeffizient [cm s^{-1}]
Pa	Pascal
R	allgemeine Gaskonstante ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
S	Siemens
s	Sekunde
T	Temperatur [K]
t	Zeit
U	Spannung [V]
U_a	Ausgangsspannung [V]
U_e	angelegte Spannung [V]
U_v	Spannung bei Schreibervollausschlag [V]
V	Volt
V_f	Verstärkungsfaktor [V/A]